N° D'ORDRE au C.N.R.S.
A O 11485

THÈSE

PRÉSENTÉE

A L'UNIVERSITE DE ROUEN
FACULTE DES SCIENCES & I.S.H.N

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

par

Monique LANÇON

ETUDE DES METHODES DE SEPARATIONS D'ISOMERES OPTIQUES A L'AIDE DE MACROMOLECULES CHIRALES SYNTHETIQUES OU BIOLOGIQUES.

Soutenue le 12 JUIN 1975

MM. E. SELEGNY, Professeur à l'Université de ROUEN — Président
R. BUVET, Professeur à l'Université P. et M. Curie, PARIS
M. CHEMLA, " " " " "
M. THELLIER, Professeur à l'Université de ROUEN — Examinateurs
A. UNANUE, Maître de Conférences à l'Université de ROUEN

N° D'ORDRE au C.N.R.S.
A O 11485

THÈSE

PRÉSENTÉE

A L'UNIVERSITE DE ROUEN
FACULTE DES SCIENCES & I.S.H.N

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

par

Monique LANÇON

ETUDE DES METHODES DE SEPARATIONS D'ISOMERES OPTIQUES A L'AIDE DE MACROMOLECULES CHIRALES SYNTHETIQUES OU BIOLOGIQUES.

Soutenue le 12 JUIN 1975

MM. E.SELEGNY, Professeur à l'Université de ROUEN — Président
R.BUVET, Professeur à l'Université P. et M. Curie, PARIS
M.CHEMLA, " " " " "
M.THELLIER, Professeur à l'Université de ROUEN — Examinateurs
A.UNANUE, Maître de Conférences à l'Université de ROUEN

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Ces recherches ont été réalisées au Laboratoire d'Electrochimie de l'Université Pierre et Marie Curie, à Paris. Monsieur E. SELEGNY, Professeur à l'Université de Rouen, en a été le guide scientifique. Je tiens à lui exprimer toute ma gratitude pour ses encouragements et ses conseils qui m'ont aidés à mener à bien ce travail.

Que Monsieur M. CHEMLA, Directeur du Laboratoire d'Electrochimie, Professeur à l'Université Pierre et Marie Curie, trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance pour m'avoir accueillie avec bienveillance dans son laboratoire et avoir accepté de juger cette thèse.

L'appui moral que m'a apporté Monsieur R. BUVET, Professeur à l'Université Pierre et Marie Curie, et ses connaissances profondes dans le domaine de la biochimie ont été pour moi un soutien important.

Je remercie Monsieur M. THELLIER, Professeur à l'Université de Rouen, ainsi que Monsieur A. UNANUE, Maitre de Conférences à l'Université de Rouen, d'avoir accepté de faire partie du jury.

J'associe à ces remerciements tous mes camarades dont l'amitié, l'esprit d'entr'aide et le concours technique à la réalisation de cet ouvrage ont été pour moi extrêmement précieux.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544711_0008

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION. 1

CHAPITRE I . Etude des séparations d'énantiomères sur résine comportant un C asymétrique

- Introduction I.1
- I.1. Etude polarimétrique en solution :
  - I.1.1. des différents isomères optiques utilisés I.3
  - I.1.2. des mélanges Désoxyéphedrine - hydroxyacide I.6
  - I.1.3. des mélanges chlorhydrate de desoxyephedrine benzylée-hydroxyacide I.12
  - I.1.4. Conclusion I.13
- I.2. Propriétés d'échange d'ions d'une résine polystyrène aminé vis à vis d'enantiomères d'hydroxyacides de la série succinique I.14
  - I.2.1. Courbe de neutralisation I.15
  - I.2.2. Echanges chlorure-hydroxyacide I.19
  - I.2.3. Absorption des constituants du racémique sur la résine base libre I.24
  - I.2.4. Elution préférentielle d'un enantiomère I.29
- I.3. Conclusion et application à l'étude en colonne de résine. I.35

CHAPITRE II . Utilisation d'enzymes insolubilisées comme agents de séparation d'enantiomères.

- II.1 Utilisation de la stéréospécificité de l'enzyme vis à vis de son substrat
  - II.1.1 Introduction II.1
  - II.1.2. Etude du comportement de D glucose en solution en présence d'une membrane albumine-glucose oxydase II.10

-II.1.2.1 Expériences à p_{O_2} = 0 (diffusion - réaction) II.12
II.1.2.2 Expériences à p_{O_2} = 0 (diffusion - adsorption) II.17
II.1.2.3. Diffusion comparée du D glucose et du D fructose à travers une même membrane à p_{O_2} = 0 II.20
II.1.2.4. Rendement de la séparation D glucose-autre ose. II.23
II.1.3. Etude des séparations D glucose-autre ose sur mousse G.O. en milieu anaérobie II.24
-II.1.3.1. Fixation-élution d'un mélange D glucose-L glucose ou D fructose II.25
II.1.3.2. Destruction du complexe enzyme substrat II.26
II.1.3.3. Etude de la quantité de D glucose fixée en fonction de la quantité introduite II.27
II.1.3.4. Cinétique de disparition du D glucose en milieu anaérobie II.29
II.1.4. Conclusion. II.31
- II.2 Utilisation de la stéréospécificité de l'enzyme vis à vis d'un inhibiteur. II.32
II.2.1. Détermination du K_M de la phosphatase acide. II.34
II.2.2. Etude de l'inhibition de la phosphatase acide par les tartrate D, L et DL
-II.2.2.1. Détermination de K_i II.36
II.2.2.2. Détermination du taux d'inhibition par le L tartrate II.38
II.2.2.3. Action du D tartrate
II.2.2.4. Inhibition par le DL tartrate II.40
II.2.3. Essais de résolution de tartrate racémique

-II.2.3.1. A l'aide de phosphatase acide en solution II.41

II.2.3.2. A l'aide de phosphatase acide insolubilisée II.45

II.2.4. Conclusion II.46

- II.3. Bibliographie .

III - CONCLUSION . C.I

TABLE DES MATIERES

Annexe I . Préparation et caractérisation de la résine à c asymétrique .

- A I.1 Préparation de la résine

A I.1.1. Méthodes générales de préparation de polymères optiquement actifs AI.1

A I.1.2. Etude de la chloromethylation du polystyrène AI.3

A I.1.3. Amination du polystyrène chloro-methylé AI.10

-A I.1.3.1. Préparation et caractéristiques des enantiomères de la desoxyephedrine AI.11

A I.1.3.2. Etude des conditions optimales de l'addition de l'amine choisie sur le polymère chloromethylé AI.12

- A I.2. Propriétés d'échangeurs d'ions de la résine vis à vis d'anions optiquement inactifs AI.16

A I.2.1. Méthodes d'étude et appareillage AI.17

A I.2.2. Détermination des coefficients d'échange sélectif de 2 ions A et B AI.19

A I.2.3. Courbes de neutralisation AI.26

- A I.3. Bibliographie . AI.30

Annexe II . Méthodes de mesures .

- A II.1. Méthodes de détermination des concentrations d'ions en solution . AII.1

A II.1.1. Dosage des chlorures AII.1

A II.1.2. Dosage des hydroxyacides par oxydation AII.1

A II.1.3. Etude du pouvoir rotatoire de com-plexes molybdomaliques et molybdotartriques AII.2

- A II.2. Détermination des concentrations des oses utilisés. AII.7
  A II.2.1. Dosage du glucose AII.7
  A II.2.2. Dosage du fructose AII.8
- A II.3. Déterminations expérimentales sur enzymes.
  A II.3.1. Spectre d'absorption de la glucose oxydose AII.9
  A II.3.2. Etude de la phosphatase acide AII.11

Annexe III . Etude bibliographique
- A III.1. Introduction AIII.1
- A III.2. Méthodes de séparation
  A III.2.1. Cristallisation AIII.3
  A III.2.2. Fractionnement chromatographique AIII.7
  A III.2.3. Chromatographie sur support solide AIII.8
  -A III.2.3.1. sur composés naturels AIII.10
  A III.2.3.2. sur résines synthétiques AIII.17
  A III.2.4. Chromatographie en phase gazeuse AIII.25
  -A III.2.4.1. séparation de diastéréoisomères sur phase stationnaire inactive AIII.27
  A III.2.4.2. séparation d'enantiomères sur phase stationnaire optiquement active AIII.31
- A III.3. Conclusion AIII.35
- A III.4. Bibliographie AIII.39

INTRODUCTION

Lorsqu'une molécule organique renferme un centre d'asymétrie - qui est le plus souvent mais pas nécessairement un atome de carbone dont les électrons périphériques sont répartis sur quatre orbitales de type sp_3 et interviennent dans des liaisons avec quatre substituants différents, le composé correspondant existe sous deux formes stéréoisomériques - ou énantiomères D et L - qui se distinguent l'une de l'autre :

- au niveau moléculaire par la position relative des quatre substituants ci-dessus dans le cas du carbone ;

- au niveau macroscopique par la seule action sur la lumière polarisée.

Ces deux formes possèdent en effet un pouvoir rotatoire de même valeur absolue mais de signe contraire alors que toutes les autres propriétés physiques et chimiques sont identiques.

On conçoit donc aisément qu'il soit extrêmement difficile de réaliser une synthèse stéréospécifique de l'un ou l'autre des énantiomères et l'expérience démontre que les essais effectués dans ce sens aboutissent presque toujours à des résultats médiocres sinon négatifs. On se trouve donc le plus généralement en présence d'un mélange équimoléculaire de deux formes D et L - dit racémique - de pouvoir rotatoire nul.

Le problème de la séparation des composants d'un tel mélange se trouve alors posé d'une manière d'autant plus aigüe qu'il revêt une très grande importance du point de vue biologique.

En effet, le monde vivant, aussi bien animal que végétal, et quelque soit le niveau d'évolution de l'organisme considéré, voit intervenir dans les grandes voies du métabolisme un certain nombre

de molécules simples à centre d'asymétrie, dont les plus importantes sont les acides α aminés et les oses. Or on constate que, à quelques rares exceptions près, un seul stéréoisomère est présent in vivo pour tous les composés d'une même classe : les α aminoacides biologiques sont presque tous de configuration L tandis que les oses appartiennent à la série D (configuration du carbone asymétrique le plus éloigné de la fonction oxo).

On voit alors apparaître l'intérêt qu'il peut y avoir à disposer synthétiquement de tel ou tel composé optiquement pur susceptible de palier à une carence d'un organisme.

L'étude de telles séparations présente en outre un double intérêt théorique : elle peut apporter un certain nombre de renseignements relatifs aux interactions intervenant dans les macromolécules et, du point de vue biophysique, permettre de préciser les conditions d'apparition des sélectivités.

C'est pourquoi, depuis quelques dizaines d'années, de nombreux chercheurs se sont penchés sur le problème de l'obtention d'énantiomères purs à partir du racémique correspondant ; les différentes méthodes mises au point dans le domaine des séparations chimiques ont été successivement appliquées à ce cas particulier, conduisant rarement à des résultats pleinement satisfaisants.

Lorsque le présent travail a été entrepris, les tentatives de séparation d'énantiomères par chromatographie sur colonne de résine synthétique asymétrique étaient fort nombreuses. Un certain nombre de succès étaient annoncés le plus souvent prématurément car il s'agissait en fait plutôt d'indices favorables permettant d'entrevoir une possibilité de séparation que de véritables élutions sélectives. Le problème était donc loin d'être résolu et il ne nous a pas semblé inutile d'essayer d'apporter notre contribution à la recherche d'une solution valable.

Comme nous le verrons dans la suite de cet exposé,

l'étude bibiographique démontre que tous les résultats encourageants obtenus à l'aide de résines synthétiques font intervenir des couples amine-acide, l'un des deux étant fixé sur la matrice insoluble pour constituer la résine asymétrique, l'autre étant en solution sous forme de mélange racémique à séparer. Le premier point consiste donc à choisir le couple amine-acide à expérimenter. L'ensemble des amino-acides ainsi que l'acide mandélique ayant fait l'objet de très nombreuses recherches, nous avons choisi, comme matière première acide, deux hydroxyacides de la série succinique, l'acide malique et l'acide tartrique. Du point de vue de l'amine, notre choix s'est fixé sur la désoxyéphédrine, d'une part parce que l'une des méthodes de préparation des deux inverses optiques de cette amine par cristallisation consiste précisément à utiliser le couple désoxyéphédrine - D tartrate et à exploiter les possibilités de séparation des deux diastéréoisomères par cristallisation fractionnée ; d'autre part, un alcaloïde très voisin, l'éphédrine permet d'obtenir de bons résultats lors d'essais de résolution d'acide DL mandélique. Du point de vue de l'asymétrie la désoxyéphédrine est un peu plus simple que l'éphédrine puisqu'elle ne comporte plus qu'un seul centre d'asymétrie au lieu de deux : le C porteur de la fonction amine N méthylée.

Le problème étant ainsi posé, nous avons, dans un premier temps, essayé de voir, par une brève étude polarimétrique en solution des divers mélanges diastéréoisomères acide-amine possibles, s'il existait bien des indices permettant d'entrevoir une différence de comportement des associations amine-acide suivant la configuration de chaque carbone asymétrique. Ce point étant établi après avoir mis au point la préparation du polymère insoluble et en avoir déterminé les propriétés échangeuses vis à vis d'ions classiques, nous avons étudié le comportement de la résine en présence des divers anions hydroxyacides choisis comme indiqué précédemment dans la série succinique ; les résultats obtenus n'étant qu'encourageants et ne permettant en aucun cas d'aboutir à une résolution efficace et systématique d'acide malique et

moins encore d'acide tartrique, nous avons essayé d'exploiter une autre technique mise au point entre temps : l'insolubilisation d'enzymes.

Les enzymes sont en effet des catalyseurs biochimiques très stéréosélectifs, qu'on ne peut envisager d'utiliser en solution à des fins séparatives en raison de leur prix de revient, très élevé dans la plupart des cas. Leur insolubilisation, qui conserve les propriétés caractéristiques de l'enzyme à 80%, permet d'envisager une telle séparation puisque l'enzyme fixée sur phase insoluble peut, après régénération, être réutilisée un grand nombre de fois.

Deux processus réactionnels possibles ont été successivement envisagés au cours de cette étude qui l'un et l'autre utilisent l'enzyme en quantité stoéchiométrique et non en quantité catalytique.

- Ou bien on utilise la stéréosélectivité d'une enzyme réagissant avec son substrat suivant :

$$E + S \underset{-1}{\overset{1}{\rightleftarrows}} ES \xrightarrow{2} E + P$$

en essayant si possible de stoper la réaction au niveau de la formation du complexe afin de récupérer ensuite le substrat en inversant,grâce à la modification des conditions expérimentales, le sens de la réaction. Le substrat se fixera sur la phase insoluble tandis que son inverse optique restera en solution. L'étude a été conduite en prenant comme exemple la glucose oxydase dont l'insolubilisation avait été bien étudiée par une équipe de chercheurs du laboratoire et son substrat, le D glucose, que l'on a essayé de séparer soit du L glucose, soit du fructose. Les résultats obtenus ne sont pas pleinement satisfaisants car il n'a pas été possible de stopper la réaction enzyme - D glucose au stade de la formation du complexe.

- ou bien on utilise les propriétés d'inhibition d'un seul énantiomère du racémique à séparer vis à vis de l'enzyme convenable. L'inhibition correspond en effet à la formation d'un complexe

suivant :

$$E + I \rightleftarrows EI$$

qui bloque les sites enzymatiques et empêche la réaction enzyme-substrat.

L'avantage de cette technique sur la précédente réside dans la non transformation ultérieure du complexe EI ; les chances de récupérer l'inhibiteur non transformé sont donc meilleures que dans le cas du substrat.

Le système choisi pour ce genre d'application est le tartrate racémique en présence de phosphatase acide. En effet, cette enzyme est inhibée compétitivement par le L tartrate qui se fixe donc sur l'enzyme en formant un complexe tandis que le D tartrate non ou très peu inhibiteur suivant l'origine biologique de l'échantillon de phosphatase acide, reste en solution.

L'ensemble des expériences effectuées au cours de ce travail n'ayant pas toujours conduit aux résultats escomptés, il ne nous a pas semblé inutile d'entreprendre une étude bibliographique générale de l'ensemble des méthodes de séparations d'énantiomères utilisées afin d'essayer d'en dégager les critères auxquels doivent satisfaire les partenaires intervenant dans la séparation pour aboutir à des résultats positifs et de voir si les systèmes choisis dans ce travail satisfont ou non aux conditions nécessaires à l'obtention de séparations valables.

Cette étude bibliographique nous a permis de mettre en évidence que les mécanismes exacts intervenant dans les séparations étaient souvent mal connus. Il est toutefois, comme nous le verrons par la suite, possible de faire appel à la thermodynamique qui s'affranchit justement d'une connaissance exacte des mécanismes pour essayer de classer les observations expérimentales à partir d'un examen des variations d'enthalpie libre, d'origine enthalpique ou entropique, mises en évidence lors des formations d'associations entre deux composés

renfermant l'un et l'autre des centres d'asymétrie. Il apparaît alors que si la différence entre les enthalpies libres de formation des associations entre un agent séparateur donné et chacun des énantiomères du racémique à séparer est grande, la sélectivité de celui-là sera grande mais la méthode de séparation ne sera pas pleinement opérationnelle par suite des difficultés de destruction de l'association la plus solide et de récupération de l'énantiomère correspondant. Tel est le cas du complexe formé entre la glucose oxydase et le D glucose qu'il est pratiquement impossible de détruire autrement qu'en continuant la réaction enzymatique, donc en transformant le D glucose.

Lorsque l'existence d'une possibilité de séparation semble trouver son origine dans une différence de vitesse de formation des deux associations, le raisonnement thermodynamique conduit à envisager des différences entre les enthalpies libres d'activation des composés intervenant, différence d'enthalpie ou d'entropie d'activation suivant les cas.

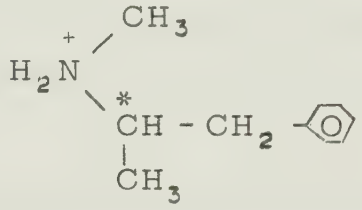
Il semble que les couples amine-acide considérés ici ne satisfassent à aucune des conditions brièvement énumérées ci-dessus, ce qui expliquerait l'échec enregistré par nous mêmes et nombre d'autres chercheurs.

CHAPITRE I

ETUDE DES SEPARATIONS D'ENANTIOMERES

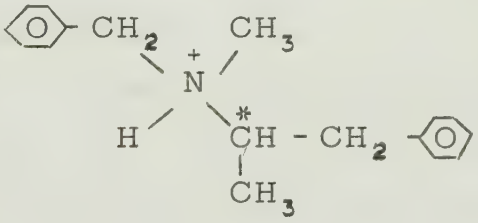
SUR RESINE COMPORTANT UN C ASYMETRIQUE

Dans le présent chapitre, nous rapportons l'ensemble des résultats et conclusions relatif au comportement des divers énantiomères des acides malique et tartrique en présence de l'un ou l'autre des inverses optiques d'une amine asymétrique, la désoxyéphédrine :



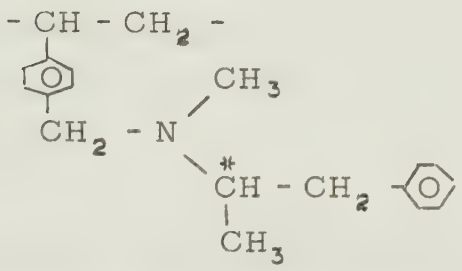
L'investigation a été conduite successivement en solution et après insolubilisation de l'amine ci-dessus fixée dans une phase résine.

L'étude des associations éventuelles amine-acide en solution a été effectuée uniquement par polarimétrie soit directement sur l'amine de départ soit sur le produit, obtenu après benzylation de cette dernière, qui correspond exactement au monomère greffé sur la chaîne polymère dans la phase insoluble :



pour lequel la présence d'un deuxième noyau aromatique modifie la réactivité par rapport à l'amine secondaire de départ.

L'étude du comportement d'ions hydroxyacides D ou L en solution en présence d'amine immobilisée dans une phase insoluble :



a été faite essentiellement par des méthodes statiques dont nous avons ensuite essayé d'adapter les résultats à des séparations en colonne de résine, voie par laquelle nous n'avons pu aboutir à l'efficacité escomptée.

Cette étude en phase insoluble a évidemment nécessité une mise au point préalable de la préparation de la résine, ainsi qu'une caractérisation de ses propriétés d'échangeur vis à vis d'ions classiques. Ces deux points n'intéressant pas directement le sujet développé ici nous en avons reporté l'exposé détaillé en annexe I, à la fin de ce mémoire. Nous signalerons seulement que la résine asymétrique a été préparée à partir de polystyrènes (P.S.) commerciaux plus ou moins pontés au divinyl benzène (D.V.B.) (polystyrène renfermant 1,1%, 3,8% ou 16% de D.V.B. soit PS 1,1 - PS 3,8 et PS 16) ces échantillons pour lesquels nous avons recherché les conditions optimales de chlorométhylation puis d'amination à la désoxyéphédrine (D ou L suivant les cas). Si l'on excepte le polystyrène le plus ponté - PS 16 - tous les échantillons préparés se sont comportés de manière identique en présence d'ions classiques - Cl^-, OH^-, $CH_3CO_2^-$, NO_3^- - Nous ne mentionnerons ici qu'un caractère particulier de ce comportement qui pouvait à priori faire craindre un échec total de la pénétration d'ions hydroxyacides dans la résine : lorsque l'échangeur d'ions, sous forme chlorhydrate, est mis en présence d'une solution aqueuse d'ions acétate, ceux-ci ne pénètrent pratiquement pas dans la résine bien que les ions chlorures

passent en solution ; ces derniers sont remplacés dans la résine par des ions hydroxyles. On pouvait donc craindre que le même phénomène se produise dans le cas d'ions organiques à squelette carboné plus important que l'acétate tels que les hydroxyacides succiniques étudiés ici. En fait l'expérience nous a prouvé qu'un tel comportement était particulier à l'ion acétate tout au moins parmi les quelques ions mis en oeuvre dans ce travail.

I - 1. Etude polarimétrique en solution des différents isomères optiques utilisés et des divers mélanges amine-hydroxyacide.

I - 1.1. Isomères optiques purs.

I - 1.1. 1). Hydroxyacides à C asymétrique de la série succinique. Les acides maliques et tartriques que nous avons utilisés ici sont solides à température ambiante et on ne peut donc déterminer le pouvoir rotatoire du produit pur. Par ailleurs, leurs solutions aqueuses présentent des pouvoirs rotatoires variant très largement et de manière anarchique avec les conditions expérimentales (concentration, température, pH du milieu) ; il est donc impossible de déterminer un pouvoir rotatoire spécifique de chacun des énantiomères de l'acide malique ou des diastéréoisomères de l'acide tartrique ; c'est la raison pour laquelle, pour nos déterminations de routine d'excès d'un composé donné en solution nous avons dû passer par l'intermédiaire de complexes molybdiques, méthode dont nous donnerons le détail au chapitre des techniques expérimentales. A titre indicatif il est possible de donner la valeur du pouvoir rotatoire $\alpha°/dm$ pour une solution de concentration donnée d'acide pur :

$\alpha°/dm$ varie entre - 0,020° et 0,005° suivant les essais pour une solution d'acide l malique 0,04 M.

$\alpha°/dm$ = 0,285° pour l'acide d tartrique 0,04 M.

$\alpha°/dm$ = - 0,095° pour l'acide l tartrique 0,04 M.

I - 1.1. 2). Désoxyéphédrine. L'amine pure est liquide (densité 0,92) à température ordinaire, son pouvoir rotatoire spécifique varie de la manière suivante pour la D (-) désoxyéphédrine :

$\lambda_{m\mu}$	589	578	546	436	365
$[\alpha]$	- 4°97	- 5°15	- 5°78	absorption	

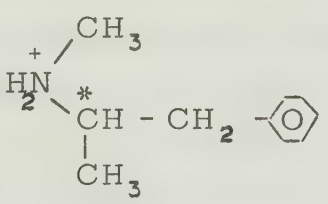
Tableau I. 1.

Pour la L (+) désoxyéphédrine que nous avons préparée, les pouvoirs rotatoires sont inférieurs en valeur absolue à ceux présentés dans le tableau précédent, ce qui indique que le produit obtenu n'est pas pur.

On trouve $[\alpha]_D = + 3°90$, ce qui correspond à une pureté optique de 80% environ, aussi avons nous par la suite travaillé de préférence sur l'énantiomère D, de pureté à peu près totale.

Nous avons, d'autre part, déterminé le pouvoir rotatoire de solutions d'amine afin d'avoir un point de comparaison lors de l'étude polarimétrique de mélanges d'énantiomères d'un acide et de l'amine.

Il n'est pas possible d'atteindre le pouvoir rotatoire d'une solution aqueuse de désoxyéphédrine sous forme base, cette dernière n'étant pas miscible à l'eau ; par contre la forme acide :



est soluble dans l'eau jusqu'à une concentration

de 2,5 g %.

Nous avons donc déterminé les pouvoirs rotatoires de solutions acides de D (-) désoxyéphédrine à diverses concentrations afin de nous assurer que la loi de Biot était respectée. Les résultats présentés dans le tableau (I. 2) correspondent à des mesures effectuées sur la raie D du sodium (λ = 589 mμ), en milieu chlorhydrique et font apparaître une valeur constante du pouvoir rotatoire spécifique : $[\alpha]_D$ = - 16°6, donc très différente de celle obtenue à partir de l'amine pure (tableau I. 1)

conc. Ml^{-1}	0,02M	0,04M	0,08M	0,17M
pds g%	0,298	0,596	1,192	2,5
α°/dm lu	- 0,049	- 0,099	- 0,198	- 0,415
$[\alpha]^{\circ}_D$	- 16°6	- 16°4	- 16°6	- 16°6

Tableau I. 2.

Au cours de cette série d'essais, nous avons d'autre part tracé le spectre ORD de la D (-) désoxyéphédrine pour des longueurs d'onde comprises entre 589 et 365 mμ. On voit (courbe I. 1) que le pouvoir rotatoire augmente rapidement avec la fréquence de la bande lumineuse passante ; mais on n'aura toutefois pas intérêt à travailler à trop faible longueur d'onde en raison des performances techniques de l'appareil utilisé ; les oscillations du compteur de lecture augmentent en effet elles aussi beaucoup avec la fréquence, ce qui neutralise l'avantage acquis par ailleurs.

Nous nous sommes enfin assurés que l'anion

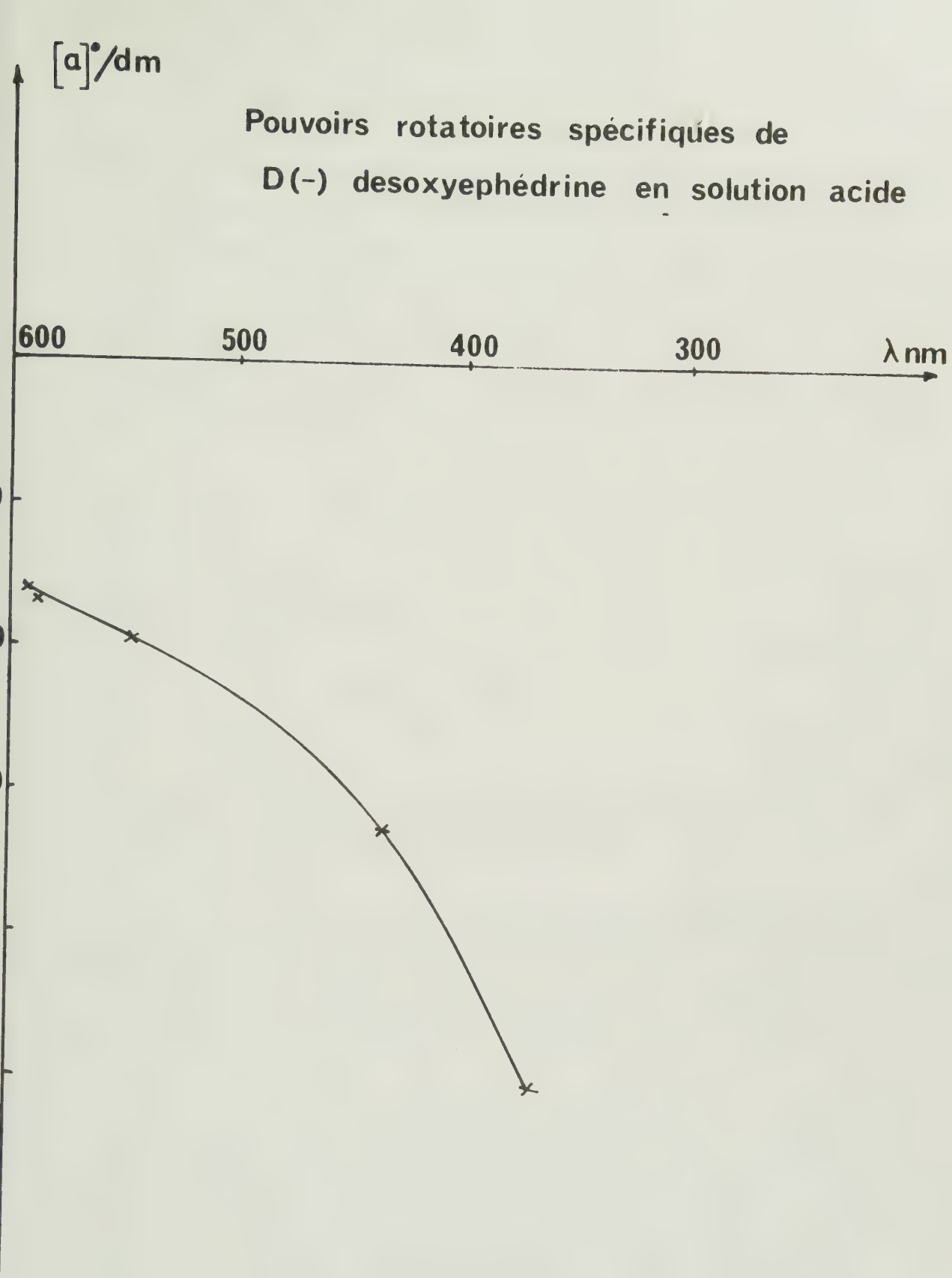
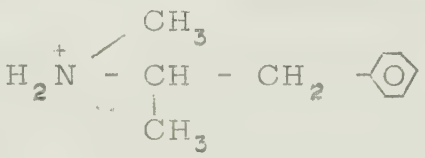
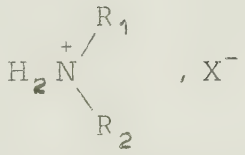

[a]°/dm
Pouvoirs rotatoires spécifiques de
D(-) desoxyephédrine en solution acide
600
500
400
300
λ nm

Fig I.1

présent dans la solution acide n'interférait pas sur la valeur du pouvoir rotatoire obtenu. Pour cela nous avons refait une série d'essais qui nous a conduit aux mêmes valeurs de pouvoir rotatoire à ± 2% près en acidifiant le milieu par l'acide acétique. La modification ainsi obtenue concernait à la fois le pH (passant de 2 à 3,5) et l'anion introduit ($CH_3CO_2^-$ à la place de Cl^-). L'identité de résultats obtenus dans les deux cas prouve que le pouvoir rotatoire mesuré est bien spécifique de :



et que le sel d'amine :



est entièrement associé en solution aqueuse, ce que les faibles concentrations utilisées permettaient de prévoir.

I - 1.2. Mélanges désoxyéphédrine - hydroxyacide. Nous avons ensuite vérifié si cela restait vrai dans le cas où l'acidification du milieu se fait non plus par un acide optiquement inactif mais par un énantiomère d'acide présentant un centre d'asymétrie.

Si le comportement reste le même que précédemment, le pouvoir rotatoire pris en solution doit être égal à la somme des pouvoirs rotatoires de l'amine et de l'acide ; ceci ne sera pas par contre plus vrai si, du fait de leurs conformations, amine et acide forment des liaisons suffisamment solides pour qu'une association partielle en solution subsiste.

Pour vérifier ce point nous avons pris les pouvoirs rotatoires de mélanges d'énantiomères correspondant aux quatre possibilités :

L amine - L acide

D amine - D acide

L amine - D acide

D amine - L acide

a diverses concentrations et ceci pour 2 acides : l'acide malique et l'acide tartrique.

I - 1.2. 1). Mélanges acide malique - désoxyéphédrine (tableau I. 3). Rappelons tout d'abord qu'aux concentrations utilisées le pouvoir rotatoire de l'acide malique est nul et que par suite, si le sel $Amine^+ Mal\ H^-$ (ou $(Amine^+)_2 Mal^=$) est entièrement dissocié en solution aqueuse, nous mesurerons pratiquement le pouvoir rotatoire de l'amine sous forme acide comme dans les exemples précédents.

Or l'examen du tableau de résultats permet d'aboutir aux conclusions suivantes :

1°) Dans le cas de mélanges D-D ou L-L on obtient toujours un pouvoir rotatoire correspondant à celui de l'amine seule et ceci quel que soit le rapport des concentrations molaires acide/amine. Donc la seule liaison existant entre 2 ions est la liaison ionique rompue en solution aqueuse diluée.

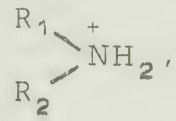
2°) Dans le cas de mélanges D-L ou L-D le pouvoir rotatoire mesuré est totalement différent de celui de l'amine seule mais les valeurs trouvées pour les couples D amine - L acide et L amine - D acide à même concentration restent symétriques (à un coefficient près correspondant à la pureté partielle de l'amine L). D'autre part les valeurs trouvées restent proportionnelles aux concentrations pour un rapport moles d'amine/moles d'acide donné. On peut donc en déduire qu'il existe sûrement une association L-D ou D-L en milieu aqueux.

Mélanges acide malique - désoxyéphédrine

C amine	0,04 M						0,02 M						0,08 M						0,04 M					
C acide	0,04 M						0,02 M						0,04 M						0,02 M					
C amine / C acide	1						1						2						2					
énant. amine	L			L			D			L			D			L			D			L		
énant. malique	D	L	DL	D	L	DL	D	L	DL	D	L	DL	D	L	DL	D	L	DL	D	L	DL	D	L	DL
pH	3,71	3,74	3,74	3,77	3,77	3,77	3,75	3,75		3,80			6,53	6,17	6,63	6,16	6,10		6,55	6,20		6,20	6,15	
α° /dm amine pure	-0°099			+0°088			-0°049			+0°044			-0°198			+0°176			-0°099			+0°088		
α° /dm lu	-0°096	-0°170	-0°115	+0°162	0°185	0°115	-0°048	-0°087	-0°065	0°079		0°063	-0°194	-0°312	-0°253	0°280	0°173	0°238	-0°100	-0°160	-0°125	0°147	0°089	0°118
α°/dm calculé			-0°135			0°124			-0°067			0°062						-0°251			-0°125			0°115

TABLEAU I. 3.

pour les deux groupes d'expériences correspondant à deux rapports moléculaires différents et à deux zones de pH (3,75 en moyenne pour $\frac{\text{amine}}{\text{acide}} = 1$; 6,50 en moyenne pour $\frac{\text{amine}}{\text{acide}} = 2$), la désoxyéphédrine sera toujours sous forme acide :



le pH du milieu restant très nettement inférieur à son pK_a (~ 9) ; par contre à pH 3,75, l'acide malique (pK_a 3,40 et 5,10) sera partiellement sous forme $HO_2C - CH_2 - \overset{*}{C}HOH - CO_2H$, qui à priori semble devoir être moins propice à la formation d'associations en solution qu'une forme ionisée ; on aura en effet alors :

$$\frac{|\text{Mal } H^-|\,|H^+|}{|\text{Mal } H_2|} = K_a = 10^{-3,40}$$

à pH = 3,75 on en déduit :

$$\frac{|\text{Mal } H^-|}{|\text{Mal } H_2|} = \frac{10^{-3,40}}{10^{-3,75}} = 10^{0,35} = 2,24$$

donc si C = 0,04 M = $|\text{Mal } H^-| + |\text{Mal } H_2|$

$$\frac{x}{0,04 - x} = 2,24 \quad x = 0,0277\text{M} = |\text{Mal } H^-| \text{ et } |\text{Mal } H_2| = 0,0123\text{M}$$

A pH 6,50 l'acide malique sera essentiellement sous forme $^-O_2C - CH_2 - \overset{*}{C}HOH - CO_2^-$ ($Mal^=$) et tous les groupes carboxyles voisins du C asymétrique seront ionisés.

Donc à pH 3,75 on peut supposer que seuls :

$$\frac{0,0277}{0,04} \times 100 = 70\%$$

des molécules maliques pourront éventuellement donner des associations type 1-1 avec l'amine, alors qu'à pH 6,50 toutes les molécules maliques en seront potentiellement capables et ceci seulement si les C asymétriques portés par les deux molécules sont de configuration inverse.

Nous allons vérifier la justesse d'une telle hypothèse sur l'un des exemples envisagés ici.

On trouve $\alpha°/dm = - 0,170°$ pour un mélange de D (-) désoxyéphédrine 0,04 M et d'acide L malique 0,04 M; si seulement 0,0277 molécules/l donnent une association D-L, il reste 0,0123 molécules/l d'amine libre ayant un pouvoir rotatoire :

$$\alpha_1 = \frac{- 0,099 \times 0,0123}{0,04} = - 0°0304$$

soit si les α sont additifs :

$$- 0,170° - (- 0,030) = - 0°14$$

représentant la rotation du plan de polarisation due à l'association DL.

Lorsqu'on met en présence 0,08 M d'amine et 0,04 M d'acide on aura, d'après les conclusions précédentes, 0,04 M d'amine libre et 0,04 M d'association, soit un pouvoir rotatoire :

$$\alpha = \alpha_{1\ \text{amine}} + \alpha_{2\ \text{association}}$$

avec :

$$\alpha_1 = - 0,099°$$

$$\alpha_2 = - 0,14° \times \frac{0,04}{0,0277} = - 0°,202$$

soit :

$$\alpha = - 0,301°$$

on trouve expérimentalement - 0,312°, la corrélation est donc bonne.

En refaisant la même calcul pour l'ensemble $\frac{\text{L amine}}{\text{D malate}} = \frac{0,08\ M}{0,04\ M} = 2$, on trouve $\alpha°/dm_{\text{calculé}} = 0°283$ alors que le résultat expérimental est $\alpha°/dm = 0°,280$, la correspondance est donc encore meilleure et il semble bien que l'on puisse admettre l'existence d'une association D désoxyéphédrine - L malate ou L désoxyéphédrine - D malate en solution aqueuse, ces associations ayant un pouvoir rotatoire spécifique de valeur absolue 17°8.

3°) Si, sur la base de l'hypothèse établie et vérifiée par le calcul au point précédent, on calcule les pouvoirs rotatoires de solutions contenant de l'amine et de l'acide malique racémique on retrouve dans les limites de la précision des mesures les valeurs obtenues expérimentalement. (tableau I. 3).

I - 1.2. 2). Mélanges acide tartrique - désoxyéphédrine. Les pouvoirs rotatoires de l'acide tartrique n'étant plus négligeables et ne suivant pas la loi de Biot, il est beaucoup plus difficile que dans le cas précédent d'analyser les résultats obtenus. Le comportement des mélanges acide-amine sera d'ailleurs modifié par suite de la présence, dans la molécule acide, non plus d'un, mais de deux C asymétriques de même configuration dans le cas d'isomère D ou L, de configuration inverse dans le cas de la forme méso.

Les pK de l'acide tartrique étant de l'ordre de 3 et 4,3 pour les composés D ou L, de 3,2 et 4,8 pour la forme DL, les espèces acido basiques prédominantes seront :

- pour l'isomère D (pH toujours > 4,3) :

$^{-}O_2C - CHOH - CHOH - CO_2^{-}$

- pour l'isomère L et pour la forme méso si le rapport molaire $\frac{\text{acide}}{\text{base}} = 1$, mélange en proportions variables suivant l'essai de deux formes : $^{-}O_2C - CHOH - CHOH - CO_2H$ et $HO_2C - CHOH - CHOH - CO_2H$

- pour le diastéréoisomère DL en présence d'un excès d'amine : $^{-}O_2C - CHOH - CHOH - CO_2^{-}$ et $^{-}O_2C - CHOH - CHOH - CO_2H$.

Dans les expériences présentées ici c'est donc l'énantiomère D, le plus ionisé qui aurait à priori, de par son ionisation, le plus de chances de donner des associations avec l'amine, or on constate qu'il n'en donne pas avec l'amine L puisque les pouvoirs rotatoires obtenus pour les mélanges sont la somme des pouvoirs rotatoires de l'acide et de l'amine. Un résultat du même type devrait se

Associations désoxyéphédrine - acide tartrique

C amine	0,04 M						0,02 M						0,08 M					
C acide	0,04 M						0,02 M						0,04 M					
C amine / C acide	1						1						2					
énan. amine	D			L			D			L			D			L		
forme tartrique	D	L	DL	D	L	DL	D	L	DL	D	L	DL	D	L	DL	D	L	DL
pH	8	3,2	3,13	8	2,67	3,06	5,32	3,14	3,13	6,37	2,68	3,07	9,47	3,97	5,41	9,46	4,61	6,01
α°/dm mine seule	- 0°099			+ 0°088			- 0°049			+ 0°044			- 0°198			+ 0°176		
α°/dm acide seul	0,285	-0°095	0°	0°285	-0°095	0°			0°			0°	0°285	-0°095	0°	0°285	-0°095	0°
α°/dm lu	-0°175	0°039	-0°125	0°370	0°213	0°115	-0°014	0°018	-0°064	0°238	0°106	0°056	-0°044	0°	-0°244	0°478	0°456	0°228
α°/dm calculé $\Sigma\ \alpha$ acide + α amine	0°186	-0°194		0°373	-0°07								0°087	-0°293		0°461	0°081	
formes acide majoritaires	$T^{=}$	TH^{-} TH_2	TH^{-} TH_2	$T^{=}$	TH_2	TH^{-} TH_2	$T^{=}$ TH^{-}	TH^{-} TH_2		$T^{=}$	TH^{-} TH_2		$T^{=}$	TH^{-}	$T^{=}$ TH^{-}	$T^{=}$	$T^{=}$ TH^{-}	$T^{=}$

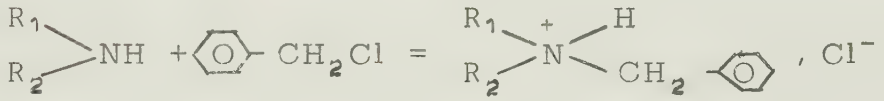
retrouver avec l'amine D en présence d'acide L ce qui n'est pas vérifié. Par contre dans tous les cas les combinaisons L-L ou D-D ont un pouvoir rotatoire nettement différencié par rapport à ce que donnerait l'amine seule. Il y a donc un léger indice d'associations L-L ou D-D , plus complète dans le cas de composés type L-L, si l'on considère la valeur absolue du pouvoir rotatoire plus importante dans ce dernier cas (tableau I. 4).

En résumé si cette étude polarimétrique ne permet de tirer aucune conclusion encourageante quant aux possibilités d'association stéréosélective tartrate-amine (que l'on sait cependant existantes grâce aux résultats de la cristallisation fractionnée) à ces concentrations, les pouvoirs rotatoires obtenus dans le cas de l'acide malique, bien différenciés et cohérents suivant la configuration des molécules d'acide et d'amine mises en contact, permettent d'entrevoir une différence d'association. Il ne semble donc pas à priori utopique d'entreprendre une étude de la séparation de ces acides racémiques sur désoxyéphédrine fixée sur matrice insoluble.

I - 1.3. Mélanges chlorhydrate de désoxyéphédrine benzylée(ou de N benzyl, N α diméthyl phénéthylamine soit BMPEA cette amine) et hydroxyacides.

Toutefois, avant de passer à la préparation de la résine, il nous a semblé intéressant de reprendre certains points de l'étude précédente avec une amine tertiaire, la BMPEA, correspondant au motif fixé sur la chaîne vinylique de notre résine.

I - 1.3. 1). Préparation de la N benzyl, N α diméthyl phénéthylamine. Cette amine s'obtient très facilement sous forme chlorhydrate par action de chlorure de benzyle sur la désoxyéphédrine suivant la réaction :



le chlorhydrate de BMPEA, D ou L suivant l'amine de départ, cristallise facilement par concentration de la solution. Après purification des cristaux obtenus par recristallisation dans l'éthanol, on mesure les pouvoirs rotatoires de solutions aqueuses, ce qui conduit aux valeurs suivantes :

$$[\alpha_D] = 18°9 \text{ pour la L BMPEA}$$

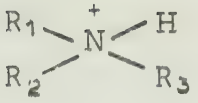
$$[\alpha_D] = -18°7 \text{ pour la D BMPEA}$$

I - 1.3. 2). Mélanges BMPEA acide malique. Nous avons ensuite étudié le comportement de mélanges de chlorhydrate de L ou D BMPEA et d'acide D ou L malique. Nous sommes partis directement du chlorhydrate d'amine en supposant que, comme précédemment celui-ci était totalement dissocié en milieu aqueux et que la présence dans la solution d'ions chlorure ne générait pas la formation éventuelle d'associations amine-malate. Il faut toutefois remarquer que ceci nous a conduit à l'obtention de solutions de pH très acide (~ 2) dans lesquelles les différents composés seront essentiellement sous forme acide, soit :

Mélanges acide malique - BMPEA

C amine	**0,04 M**						0,02 M						0,08 M						0,04 M					
C acide	**0,04 M**						0,02 M						0,04 M						0,02 M					
C amine C acide	1						1						2						2					
énant. amine	D			L			D			L			D			L			D			**L**		
énant. malique	D	L	DL	D	L	DL	D	L	DL	D	L	DL	D	L	DL	D	L	DL	D	L	DL	D	L	DL
pH	2,09	2,03	2,07	2,07	2,01	2,07	2,10						2,10		2,07		2							
α°/dm amine seule	-0°180			0°182			-0°090			0°091			-0°360			0°364			-0°180			0°182		
α°/dm lu	-0°188	-0°210	-0°202	0°214	0°185	0°200	-0°093	-0°109	-0°105	0°105	0°095	0°103	-0°387	-0°403	-0°392	0°410	0°375	0°380	-0°192	-0°210	-0°208	0°206	0°192	0°200
α°/dm calculé			-0°199			0°200			-0°108			0°100		-0°390	-0°382	0°396		0°382		-0°199	-0°196	0°196		0°194

TABLEAU I. 5



pour l'amine

$HO_2C - CH_2 - CHOH - CO_2H$ pour l'acide

il n'y aura donc pas de possibilité de liaison ionique entre les deux et on se trouve de ce fait dans les conditions les plus défavorables à une éventuelle association en solution.

Or si l'on examine les résultats expérimentaux rassemblés dans le tableau (I. 5), on constate que l'on peut aboutir aux mêmes conclusions que dans le cas de la désoxyéphédrine : lorsqu'on met en présence deux molécules de même configuration, on retrouve le pouvoir rotatoire de l'amine seule, alors que lorsque amine et acide ont des configurations inverses, le pouvoir rotatoire est très nettement modifié. De plus dans le cas ou le rapport moléculaire $\frac{\text{amine}}{\text{acide}} = 2$, le pouvoir rotatoire du mélange DL ou LD est sensiblement la somme des pouvoirs rotatoires de l'excès d'amine d'une part, et de l'association 1-1 d'autre part.

On voit donc ainsi se confirmer la possibilité d'existence en solution aqueuse diluée, c'est à dire dans des conditions peu favorables, d'associations préférentielles de type L amine - D acide ou l'inverse.

I - 1.3. 3). Mélanges BMPEA - acide tartrique. Dans le cas de mélanges acide tartrique BMPEA (tableau I. 6), il est extrêmement difficile de conclure, les résultats expérimentaux étant très dispersés ; on peut seulement en dire qu'ils ne correspondent en aucun cas à la somme des pouvoirs rotatoires amine + acide.

I - 1.4. Conclusion. L'étude polarimétrique en solution sur le motif monomère de la résine fait donc espérer la possibilité d'existence d'une association préférentielle type L-D entre acide malique et amine qui permet d'escompter une séparation des énantiomères

Mélanges acide tartrique - BMPEA

C amine	0,04 M						0,02 M						0,08 M						0,04 M					
C acide	0,04 M						0,02 M						0,04 M						0,02 M					
C amine / C acide	1						1						2						2					
énant. amine	D			L			D			L			D			L			D			L		
diast. acide	D	L	DL	D	L	DL	D	I.	DL	D	L	DL	D	L	DL	D	L	DL	D	L	DL	D	L	DL
pH		6	7,6	1,74	1,74	1,74	8,09	5,50	7,6	1,90	1,90	1,90		1,70	1,7	8,50	1,70	1,70				8,50	1,75	
α°/dm amine seule	- 0°180			0°182			- 0°090			0°091			- 0°360			0°364			- 0°180			0°182		
α°/dm acide seul	0°285	-0°095		0°285	-0°095								0°285	-0°095		0°285	-0°095							
α°/dm lu	x	0°062	-0°190	0°415	0°282	0°183	0°020	0°018	-0°1	0°151	0°	0°046	x	-0°283	-0°375	0°310	0°460	0°370	x	-0°145		0°157	0°240	0°195

x mélanges opaques pour lesquels il n'a pas été possible de mesurer α°/dm

TABLEAU I. 6

de cet acide par passage sur résine anionique préparée à partir d'un énantiomère de la désoxyéphédrine. C'est ainsi qu'une résine D (-) devrait retenir préférentiellement l'acide L malique et de ce fait permettre d'obtenir un éluat enrichi en isomère D. Il est par contre beaucoup plus difficile de prévoir une possibilité ou non de séparation dans le cas de l'acide tartrique.

I - 2. Propriétés d'échange d'ions d'une résine polystyrène aminé, vis à vis d'énantiomères d'hydroxyacides de la série succinique.

Nous avons ensuite entrepris l'étude du comportement de l'amine insolubilisée face aux énantiomères des deux hydroxyacides étudiés en solution, soit les acides maliques et tartriques, afin de déterminer les valeurs des coefficients d'échange sélectif K_D^L pour chaque couple d'inverses optiques.

Cette étude a été effectuée essentiellement avec l'échantillon de polystyrène le moins ponté qui est aussi celui possédant la meilleure accessibilité aux sites réactifs, ce que le comportement face aux anions classiques a bien confirmé (annexe I) ; de plus, comme nous l'avons signalé précédemment, nous avons choisi de travailler de préférence sur un polymère aminé à la D (-) désoxyéphédrine, l'isomère D de l'amine étant obtenu pratiquement pur, ce qui n'est pas le cas de son antipode (obtenu au laboratoire avec une pureté optique de 80% seulement). Toutefois un certain nombre d'essais ont été faits sur les PS 1,1 D ou L et 3,8 D ou L, seul le PS 16 a été systématiquement éliminé en raison de son degré de pontage trop important.

Pour estimer les coefficients d'échange sélectif, nous avons repris des expériences de même type que celles effectuées dans le cas d'anions classiques, soit :

- comparaison des courbes de neutralisation directe et en retour d'une résine donnée par les deux énantiomères d'un même acide.

- échange chlorure-hydroxyacide.

- absorption des constituants d'un racémique sur la résine base libre.

- élution sélective des énantiomères après saturation de la résine en racémique.

Nous allons donc voir quelles sont les conclusions auxquelles ces différentes méthodes ont permis d'aboutir.

I - 2.1. Courbes de neutralisation. Le premier but de cette série de courbes était de s'assurer qu'il y avait bien une possibilité de pénétration des anions hydroxyacides dans la résine, ce qui n'était nullement évident, comme nous l'avons vu, à la suite des résultats obtenus en présence d'ions acétate. Si l'anion organique RCO_2^- ne pénètre pas dans la résine, d'une part le pH de la solution se stabilisera très vite après chaque addition d'acide RCO_2H, d'autre part la courbe de variation du pH en fonction de la quantité d'acide ajoutée correspondra à la courbe de dilution de l'acide considéré, ce qu'on a observé avec l'acide acétique. On a donc là un moyen rapide de voir s'il y a ou non fixation possible de l'anion étudié sur la résine.

Dans tous les cas étudiés successivement : acides D et L malique puis D et L tartrique, les courbes obtenues ont une allure très comparables à celle des courbes obtenues lors de la neutralisation par l'acide chlorhydrique ; On est donc assuré que les ions malate et tartrate pénètrent dans la résine. On remarque d'autre part que le cycle obtenu en traçant la courbe de neutralisation directe par l'acide et retour par la potasse est très voisin pour les polystyrènes PS, PS 1,1 et PS 3,8 aminés par le même énantiomère de la désoxyéphédrine et neutralisés par un même acide optiquement actif. Donc le taux de pontage de la matrice polymère n'influence pas l'allure de la courbe de neutralisation tout au moins tant qu'il reste inférieur à 3,8%. C'est pourquoi nous ne présentons qu'une courbe pour chaque couple amine/acide ; les conclusions auxquelles leur comparaison permet d'aboutir

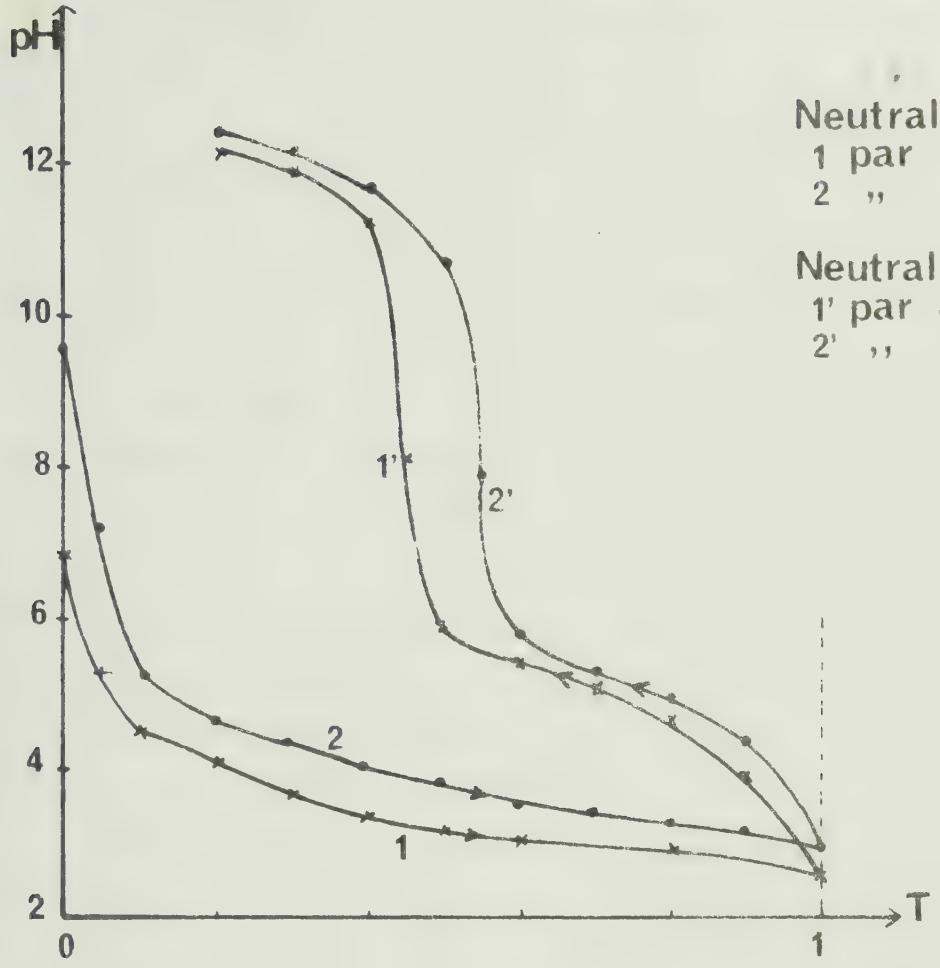
sont valables pour les trois polymères étudiés.

Il faut tout d'abord noter que, bien que les additions d'acide ou base aient été faites de 0,1 en 0,1 meq./1 meq. résine toutes les 24 heures seulement, le cycle d'hystérésis est important, ce qui prouve qu'on est très hors équilibre donc que les échanges sont extrêmement lents ; ceci ne fait que confirmer les résultats obtenus lors de la neutralisation par des acides forts minéraux (annexe I) et était prévisible en raison de la taille des anions organiques, supérieure à celle d'un anion tel que le chlorure.

I - 2.1. 1). Acide malique. Si l'on compare les courbes de neutralisation d'une même résine, comportant un carbone asymétrique D par exemple (figure I. 2), on constate que la courbe de neutralisation par l'acide D malique est toujours en-dessous de celle correspondant à l'acide L malique. Cela signifie donc qu'à tout moment, il y a plus d'acide D malique que L malique en solution ; donc, lors de la neutralisation directe, l'énantiomère L pénètre plus facilement que le D dans la résine ; par contre, lors de la neutralisation en retour, l'isomère L malique ressort moins facilement que D de la résine et il reste à tout moment plus d'ions hydroxyles en solution. On peut donc conclure à l'existence d'une association D amine - L acide préférentielle qui d'une part se forme plus facilement que D amine - D acide et qui, une fois formée, est plus difficile à détruire. Ce résultat est tout à fait en accord avec ce qui a été obtenu lors de l'étude en solution.

Les courbes correspondant à la neutralisation de la résine PSL par les deux acides D et L malique sont comparables aux précédentes à condition d'inverser leur position relative. Le cycle des deux courbes (1) et (1'), figure I. 2, correspondrait à l'acide L malique, (2') à l'acide D malique ; le même raisonnement que ci-dessus conduit alors à prévoir une association L amine - D acide préférentielle et il ne nous a pas semblé utile de donner les courbes obtenues expérimentalement.

Neutralisation PS1,1D

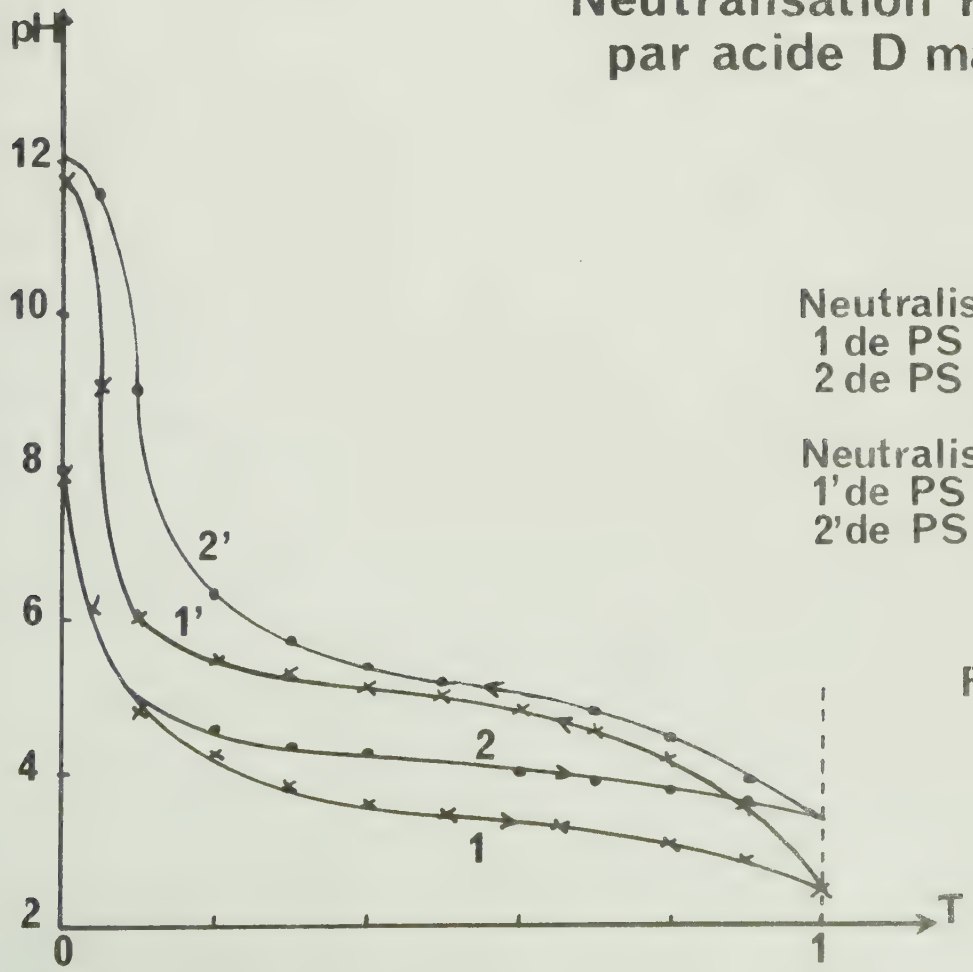


Neutralisation directe
1 par ac. D malique
2 ,, ,, L ,,

Neutralisation en retour
1' par ac. D malique
2' ,, ,, L ,,

Fig I.2

Neutralisation PS 3,8D et L par acide D malique



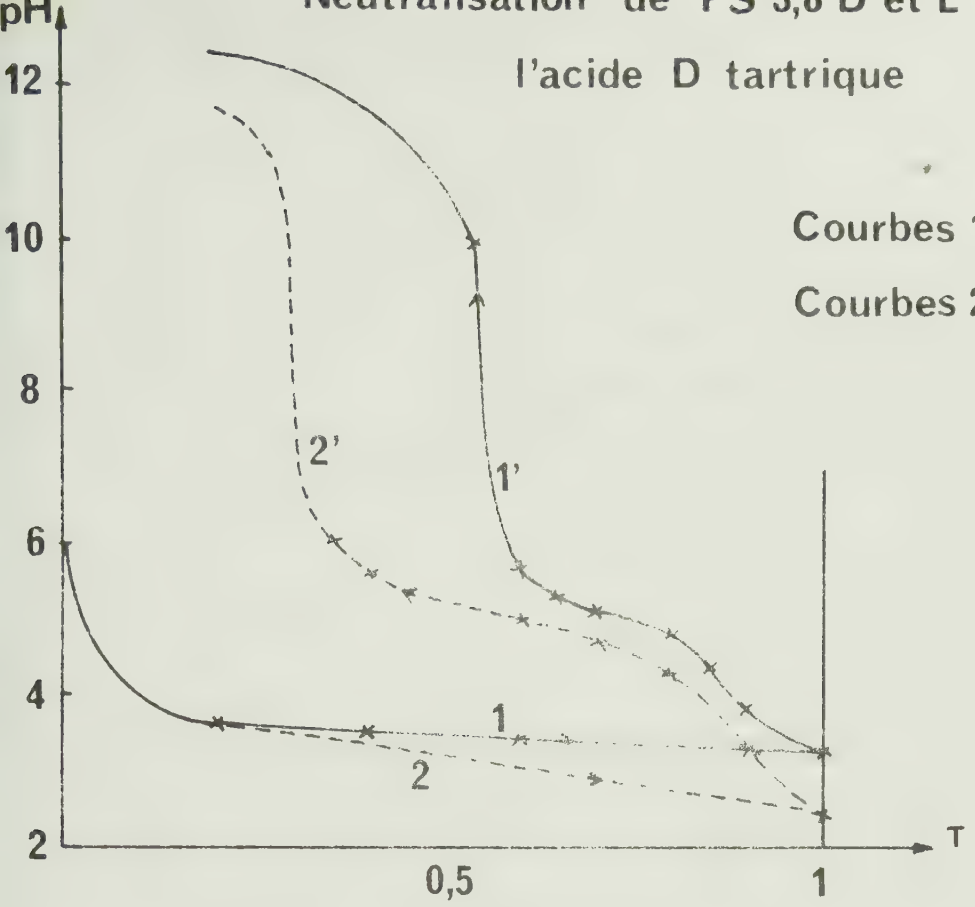
Neutralisation directe
1 de PS 3,8 D
2 de PS 3,8 L

Neutralisation en retour
1'de PS 3,8 D
2'de PS 3,8 L

Fig I. 3

De même, si l'on compare les cycles de neutralisation de deux résines symétriques - par exemple PS 3,8 L et PS 3,8 D (figure I. 3) - par un même isomère optique de l'acide malique - D par exemple - on observe encore un décalage systématique entre les deux courbes, décalage ayant lieu vers les pH acides pour la résine PS 3,8 D dans l'exemple choisi ici. Ceci confirme donc que l'acide D malique pénètre moins bien dans la résine renfermant le centre d'asymétrie D que dans l'autre, mais que, par contre, il en ressort plus facilement. On peut donc en conclure que l'association L amine - D acide est plus solide que l'association D amine - D acide . Ces quelques résultats montrent donc bien que les caractéristiques des associations L-D observées en solution sont conservées lorsque l'un des deux protagonistes - ici l'amine - est fixé sur une matrice solide. Nous nous sommes d'ailleurs appliqués à le vérifier dans le cas de toutes les combinaisons acide/amine possibles et sur tous les polymères, mais il ne nous a pas paru utile de rapporter ici la totalité des résultats qui tous convergent vers une même conclusion.

I - 2.1. 2). Acide tartrique. Dans le cas de l'acide tartrique, l'examen des courbes de neutralisation ne permet pas d'aboutir à des conclusions très nettes. En effet si l'on compare 2 cycles de neutralisation de 2 résines, de même matrice mais renfermant 1 carbone asymétrique, l'une D l'autre L, par un même acide, D par exemple (figure I.4), le décalage vers les pH acides est très net pour la résine L, ce qui permet de conclure à une association D - D préférentielle . Par contre les deux courbes de neutralisation d'une même résine PS 1,1 D par les 2 diastéréoisomères tartriques D et L ne laissent apparaître que des différences de l'ordre de la précision expérimentale ; seul le décalage du point de neutralisation en retour permet de supposer l'existence d'une association D acide-D amine plus stable que L acide-D amine.

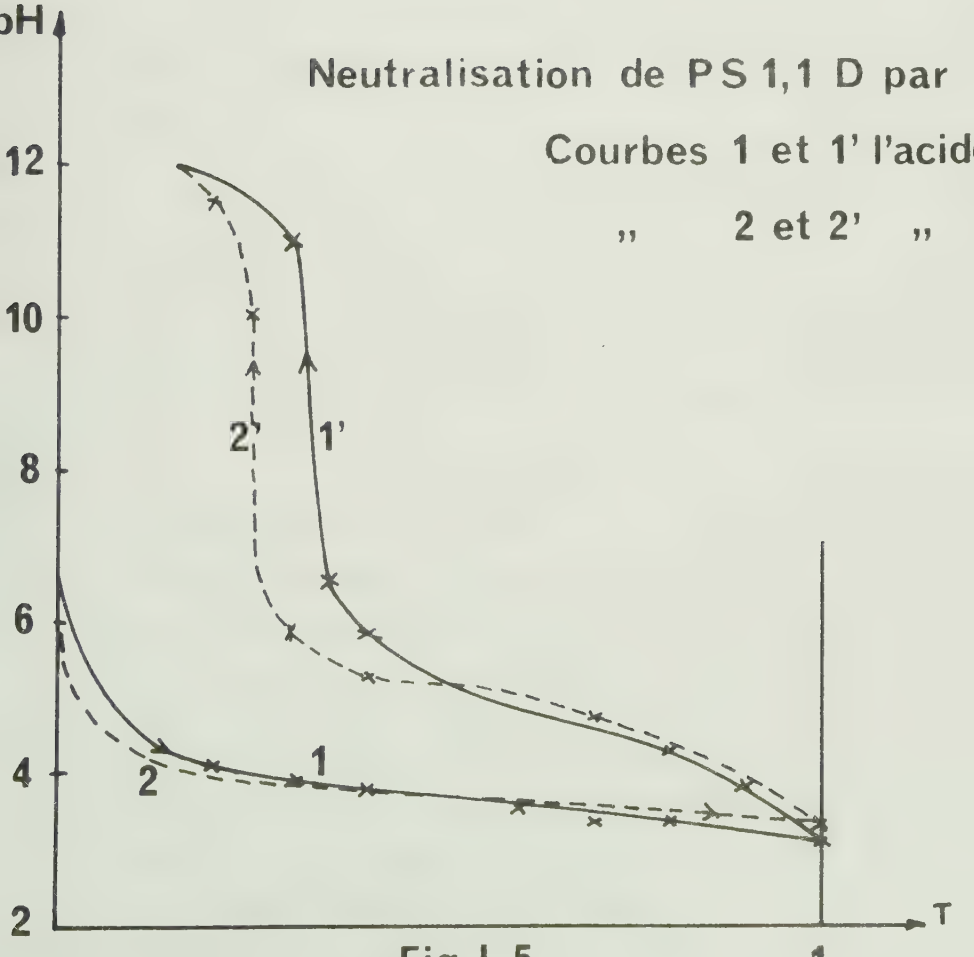


Neutralisation de PS 3,8 D et L par l'acide D tartrique

Courbes 1 et 1' : PS 3,8 D

Courbes 2 et 2' : PS 3,8 L

Fig I. 4



Neutralisation de PS 1,1 D par

Courbes 1 et 1' l'acide D tartrique

„ 2 et 2' „ L „

Fig I. 5

Pour préciser ce point, nous avons effectué un essai cinétique dans les conditions suivantes : nous avons suivi l'évolution de pH d'une solution normale d'acide tartrique de configuration déterminée mise en contact avec un échantillon de résine PSD (le rapport de la capacité théorique de la résine à la quantité d'acide en équivalent étant égal à 1). Cet essai (figure I. 6) montre que :

1). Le pH atteint sa valeur d'équilibre à 0,1 unité près en 24 heures.

2). Le pH de la solution D tartrique reste constamment nettement supérieur à celui de la solution L tartrique, ce qui prouve qu'une quantité plus importante d'acide D tartrique est passée dans la phase insoluble. On a donc bien ainsi une confirmation de l'existence d'une association D amine - D tartrate préférentielle. Notons que cette différence de pH de l'ordre d'une demi-unité ne peut être prise en considération pour un calcul des concentrations relatives des acides D tartrique ou L tartrique en solution. En effet, partant de la formule exprimant le pH d'une solution d'acide faible en fonction de sa concentration.

$$pH = \frac{1}{2}(pK_a - \log c) \Rightarrow \log c = pK_a - 2pH$$

on voit qu'une augmentation de pH de 0,5 unité correspond à une dilution 10 fois, or il n'y a sûrement pas dix fois plus d'acide D tartrique que d'acide L tartrique passant dans la phase solide.

En conclusion de cette série d'essais on peut donc dire que les résultats obtenus lors de l'étude préalable en solution des associations acide-amine paraissent se retrouver lorsque l'amine est fixée sur une matrice polymère ; ils sont, dans un cas comme dans l'autre, beaucoup plus nets lorsque l'hydroxyacide étudié ne comporte qu'un seul carbone asymétrique D ou L (acide malique) ; il semble que l'introduction d'un deuxième centre d'asymétrie identique au premier (acide tartrique) diminue les chances de séparation et inverse le type d'association préférentielle formée.

Evolution du pH d'une solution normale d'acide tartrique en présence de résine PS.D sous forme base libre (1 meq acide / 1 meq résine)

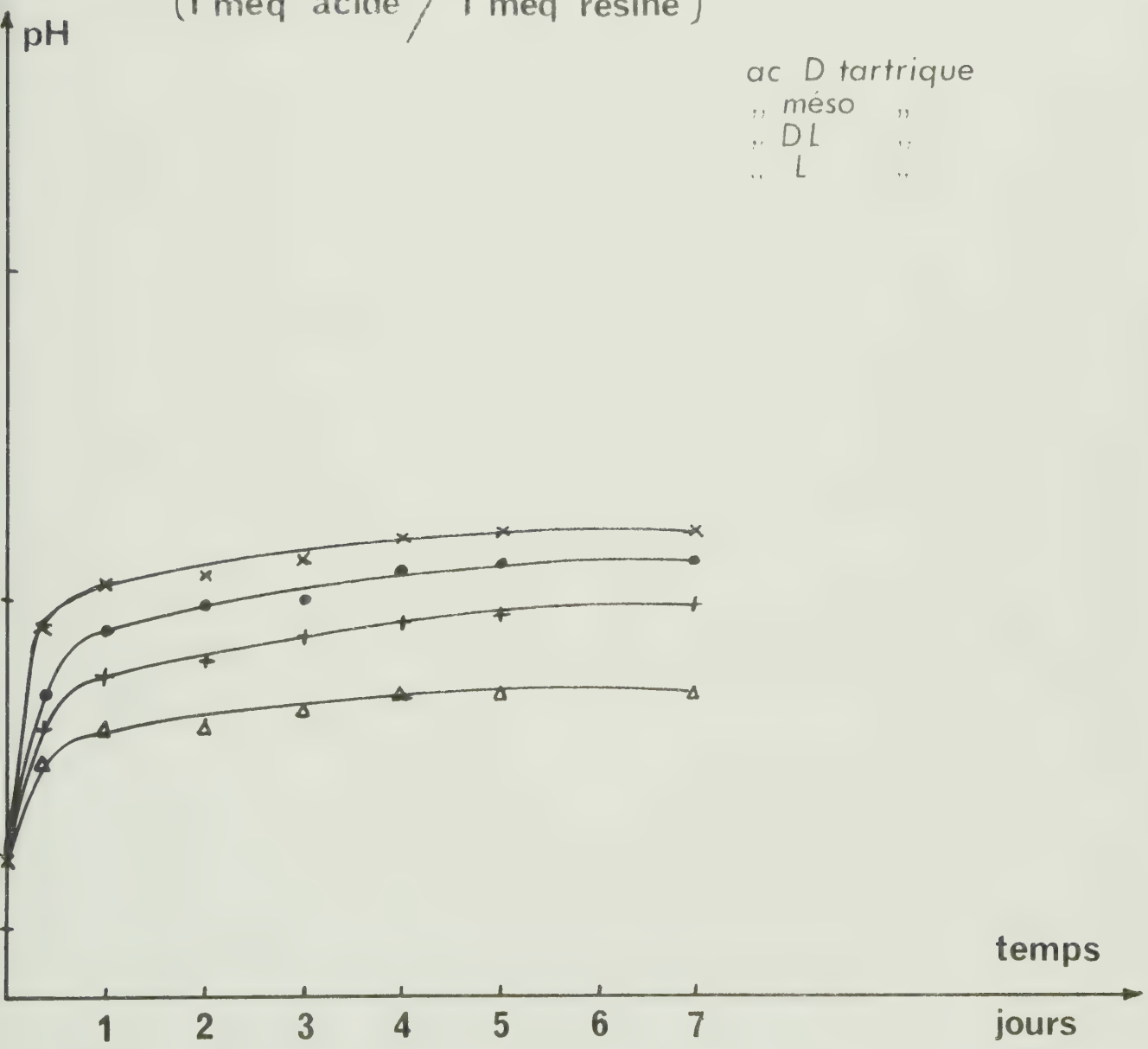


Fig I.6

Comme nous le verrons par ailleurs - annexe I - au sujet des acides minéraux, il est possible, à partir des courbes de neutralisation d'estimer des coefficients d'échange sélectif.

Reprenant l'exemple de la résine PSD et des acides D et L maliques, ceci conduit aux valeurs suivantes (tableau I.7) : soit à une valeur moyenne de 3,50 pour K_D^L qui est assez élevée et très favorable théoriquement à une séparation des 2 énantiomères au moyen de notre polymère.

τ	pH_D	pH_L	$\log K_D^L$	K_D^L
0,1	4,45	5,05	0,6	3,98
0,3	3,70	4,35	0,65	4,47
0,5	3,20	3,80	0,6	3,98
0,7	2,85	3,40	0,55	3,55
0,9	2,65	3,15	0,50	3,16
1	2,50	3	0,50	3,16

Tableau I. 7

Dans le cas de l'acide tartrique les courbes de neutralisation D ou L étant très voisines, les K_D^L sont évidemment voisins de 1 à tous les pH.

L'étude des courbes de neutralisation conduisant à des résultats encourageants nous avons ensuite effectué toute une série d'essais statiques d'échanges d'ions dans diverses conditions mais sans jamais prolonger les temps de contact résine-solution jusqu'à ce que l'équilibre soit atteint.

I - 2.2. Echanges chlorure hydroxyacide . Il nous a paru intéressant de voir si la résine telle quelle est obtenue lors de sa préparation, c'est à dire sous forme chlorhydrate, est ou non utilisable pour notre propos. L'amine est donc sous forme acide, chargée

positivement, forme qui est la seule permettant d'obtenir des associations en solution. Par contre, la caractérisation classique - annexe I - montre que notre échangeur possède une affinité exceptionnelle pour l'ion chlorure ; de ce fait l'échange chlorure malate risque de n'être que très partiel et par suite, même si la sélectivité existe, ne se manifestera que fort peu dans ces conditions.

Dans une première série d'essais, nous avons mis la résine PSD en présence, d'une part d'acide malique racémique, d'autre part d'acide L malique qui sont les deux formes les plus faciles à obtenir commercialement.

Nous avons déterminé expérimentalement les coefficients d'échange apparents K_L^{Cl} et K_{DL}^{Cl} dont il est possible de déduire :

$$K_{DL}^{L} = K_{Dl}^{Cl} \times \frac{1}{K_L^{Cl}} \quad ;$$

une valeur de ce coefficient supérieure à l'unité signifiera que l'énantiomère L pénètre mieux dans la résine que le racémique donc à fortiori que l'énantiomère D.

Ces déterminations ont été faites pour différentes valeurs du rapport :

$$\frac{\text{moles de malate}}{C_{th}\ \text{résine}} \quad \text{et les} \quad K_{Mal.}^{Cl}$$

ont été calculés en supposant que l'acide malique ne se fixait que sur une fonction amine ; ceci est, en effet, vraisemblable pour diverses raisons :

- étant données les valeurs de pH de la solution mise en contact avec la résine, l'acide malique s'y trouve majoritairement sous forme non ionisée donc peu favorable à la fixation.

Lors de l'étude en solution, nous avons vu que, s'il existait des associations acide amine, elles étaient certainement de type 1-1 ; elles le seront donc à fortiori dans le cas considéré ici

où la mobilité relative des molécules d'amine, fixées sur une matrice polymère, est nulle.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau I. 8.

$t = \frac{\text{moles ac.}}{Cth}$	forme malique	pH éluat	Solution meq Cl^-	Solution m moles Mal.	Résine meq Cl^-	Résine m moles Mal.	K^{Cl}_{Mal}	K^{l}_{dl}
2	dl	2,60	0,26	1,79	0,74	0,21	24,2	1,35
	l	2,19	0,30	1,77	0,70	0,23	17,9	
1	dl	2,71	0,22	0,86	0,78	0,14	21,8	1,80
	l	2,49	0,26	0,81	0,74	0,19	12,1	
0,5	dl	2,82	0,19	0,38	0,81	0,12	13,5	1,65
	l	2,62	0,23	$0,35_5$	0,77	$0,14_5$	8,2	
0,25	dl	3,05	0,15	$0,14_5$	0,85	$0,10_5$	7,8	1
	l	3,72	0,16	0,15	0,84	0,10	7,8	

Tableau I. 8

Comme on le prévoyait, la valeur du coefficient d'échange K^{Cl}_{Mal} est toujours très élevée et, seule une faible proportion de l'acide malique présent en solution pénètre dans la résine ; il ne sera donc pas possible d'enrichir notablement la solution en un énantiomère par une telle technique ; peut être sera-t-il tout au plus concevable d'améliorer un peu les résultats précédents en agissant sur le pH de la solution mise en contact avec la résine. On voit en effet que les pH notés dans le tableau I. 8 sont toujours inférieurs au premier pK de l'acide malique ; les ions Mal H^- sont donc peu nombreux en solution (10% de l'acide total introduit pour un pH 2,4 dans les conditions de concentration utilisées) et les ions $Mal^=$ sont inexistants.

Comme la présence d'au moins une charge négative sur la molécule malique paraît indispensable à la formation éventuelle d'une association avec l'amine (elle-même chargée positivement), une augmentation du pH, augmentant la proportion d'ionisation de l'acide, augmentera les chances d'échange chlorure-malate.

C'est pourquoi nous avons refait une série d'essais identiques aux précédents à la modification d'un facteur près, le pH de la solution. Quelques résultats numériques, rassemblés dans le tableau I. 9, montrent qu'il est alors même possible d'inverser l'ordre d'affinité de la résine pour les deux ions considérés, chlorure et malate.

On remarque que dans le cas où la solution contient des ions Mal H^- au départ, la quantité d'ions Cl^- élués est toujours supérieure - de 20 à 35% - à celle des moles maliques ayant disparu de la solution donc pénétré dans la résine.

moles mal. Cth	forme Malique	pH éluat.	Solution meq Cl^-	Solution mmoles Mal.	Résine meq Cl^-	Résine mmoles Mal.	K^{Cl}_{Mal}	K^{l}_{dl}
2	dl Mal H^-	4	0,81	1,40	0,19	0,60	0,55	1,08
	l Mal H^-	3,98	0,84	1,46	0,16	0,54	0,51	
1	dl Mal H^-	3,85	0,62	0,58	0,38	0,42	0,85	1,18
	l Mal H^-	3,83	0,67	0,59	0,33	0,40	0,72	
1	dl Mal$^=$	5,50	1	0,57	0	0,43		
	l Mal$^=$	5,53	1	0,89	0	0,11		

Tableau I. 9

L'explication la plus simple de ce phénomène conduit à admettre que certaines des molécules maliques se fixent par chacune des deux fonctions carboxyliques sur deux fonctions amine présentes sur la résine, libérant ainsi deux ions chlorure. Nous avons vu que cette hypothèse est peu vraisemblable puisqu'en solution les associations sont de type 1-1 et que, dans le cas présent il existe un facteur

limitant supplémentaire par rapport au cas de la solution : les molécules d'amine qui étaient mobiles en solution sont ici fixées sur une matrice rigide, donc ont peu de chance de se trouver en position relative convenable pour que deux d'entre elles se fixent sur la même molécule d'acide malique.

Il paraît alors plus raisonnable d'admettre que nous sommes ici en présence d'un phénomène analogue à celui observé avec les ions acétate mais en moindre proportion. Une partie seulement des ions chlorure élués sont remplacés par des ions maliques Mal H^- (ou $Mal^=$), le reste étant échangé avec des groupements hydroxyle OH^-. La pénétration du malate dans la résine est d'ailleurs d'autant plus faible que la solution initiale de cet anion est plus diluée, ce qui est normal, l'échange étant soumis à une relation d'équilibre :

$$Res\ NH^+Cl^- + Mal\ H^-_{sol.} \rightleftarrows Res\ NH^+\ Mal\ H^- + Cl^-_{sol.}$$

Il intervient par ailleurs un deuxième équilibre :

$$Res\ NH^+\ Cl^- + OH^-_{sol.} \rightleftarrows Cl^-_{sol.} + \begin{matrix} Res\ NH^+\ OH^- \\ Res\ N,\ H_2O \end{matrix}$$

Enfin si l'on calcule $K^1_{Dl} = K^{Cl}_{Dl} \times K^1_{Cl}$

la valeur obtenue est presque toujours supérieure à 1 sauf dans deux cas :

- lorsque la quantité initiale d'acide malique en solution ne représente que le 1/4 de la capacité totale de la résine ; l'imprécision sur la mesure de la quantité d'acide malique disparue est alors très grande, cette quantité étant faible en valeur absolue, il paraît hasardeux de tirer une conclusion de cet essai.

- lorsque le malate est sous forme $Mal^=$, mais il n'est alors pas possible de calculer K^1_{dl} comme précédemment $Cl_{res.}$ étant nulle.

Cette dernière série d'essais vient donc suggérer que l'association D amine - L acide est préférentielle dans le cas présent, comme elle l'était déjà en solution puisque les coefficients K^l_{dl} sont supérieurs à l'unité et, qu'en conséquence, K^l_d devrait prendre des valeurs encore plus grandes.

D'un point de vue pratique, il semble tout de même peu probable d'arriver à réaliser une séparation convenable à partir d'une résine sous forme chlorhydrate, car ou bien les coefficients d'échange sont bons mais l'enrichissement en solution n'est que de 2 à 4% en forme l, la plus grande partie des ions maliques en solution ne participant pas à l'échange , ou la plus grande partie des ions maliques pénètre dans la résine mais les coefficients d'échange sélectif sont alors peu favorables à une séparation.

Il aurait été intéressant de voir si, dans le cas où l'acide racémique est mis en présence de chlorhydrate d'amine, les deux énantiomères l et d pénètrent bien en quantité inégale dans le polymère, ce que suggèrent les résultats obtenus. Malheureusement il n'a pas été possible d'effectuer un dosage polarimétrique sur les solutions, une précipitation intervenant lors de l'addition, nécessaire au dosage, de paramolybdate d'ammonium.

Cette précipitation est vraisemblablement due à la formation d'un complexe ternaire molybdate - malate - chlorure de très faible solubilité.

Devant les résultats peu encourageants fournis par les échanges chlorure - malate, il n'a pas semblé utile de reprendre une étude semblable avec le tartrate, cet hydroxyacide conduisant toujours à des résultats moins bons que le précédent.

I - 2.3. Absorption des constituants du racémique sur la résine base libre. L'étude des courbes de neutralisation d'un polymère donné par les deux énantiomères de l'acide malique a permis

de calculer de bons coefficients d'échange sélectif K_d^l . Si donc on met en présence d'une résine, non plus l'un ou l'autre des isomères optiques mais le mélange racémique des deux, il semble que ces derniers doivent pénétrer en quantité inégale dans la phase solide.

Nous avons donc mis la résine en contact avec des solutions d'acide malique racémique $\frac{M}{20}$ (soit 20 cm^3 de solution pour 1 meq théorique de résine dans le cas d'un rapport mmoles malique/meq résine = 1). Chaque échantillon de résine basique est mis en contact successivement avec plusieurs fractions identiques de solution initiale afin de reproduire ce qui se passe au niveau d'une tranche de colonne échangeuse d'anions lors d'une séparation par fixation. C'est aussi pour cette dernière raison que nous avons limité à une heure les contacts polymère-solution, bien qu'ayant établi par ailleurs que la cinétique d'échange était très lente ; on élimine donc chaque fraction de solution bien avant que l'équilibre de répartition des ions entre les deux phases solide et liquide soit atteint.

Les résultats obtenus, dont un exemple est donné dans le tableau I. 10. , permettent de calculer des coefficients d'échange K_d^l légèrement favorables à la forme l, puisque toujours et parfois même très largement supérieurs à l'unité, mais restant inférieurs à ceux calculés à partir des courbes de neutralisation. De plus un examen approfondi des valeurs obtenues conduit à conclure qu'il n'y a en fait aucune distinction entre les deux formes l et d dans ce type d'expérience de fixation ; en effet, si l'on calcule le rapport $\frac{\bar{l}}{(\bar{d})}$ des concentrations des deux isomères dans la résine, on constate que ce dernier ne s'écarte pas notablement de l'unité puisqu'on a toujours $1,02 < \frac{\bar{l}}{\bar{d}} < 1,05$; les valeurs supérieures à l'unité de K_d^l sont donc dues essentiellement à la variation des concentrations des énantiomères l et d en solution. Or on remarque que, pour une quantité donnée de solution, la différence (l) - (d) est constante et égale à sa valeur dans la solution initiale.

Donc d et l ont pénétré en quantité égale dans la résine. De tels essais ont été faits sur chacun des types de polymère

dont nous disposions et tous les résultats sont concordants.

De plus, même si l'on se rapproche de l'équilibre en prolongeant à 24 heures le temps de contact de chaque fraction de solution avec la résine, aucune différenciation entre les deux isomères n'apparaît, ce qui est en contradiction avec les conclusions obtenues à partir des courbes de neutralisation. Divers essais correspondant à des quantités d'acide racémique mises en présence de résine plus ou moins importantes, mais toujours grandes, devant chaque addition d'acide effectuée lors d'une courbe de neutralisation, permettent de fixer une quantité globale d'acide plus ou moins grande mais sans que le moindre pouvoir rotatoire soit décelable dans la solution restante. Quelques uns des résultats obtenus, rassemblés dans le tableau I - 11. montrent que le taux de saturation de la résine en acide malique augmente avec la concentration de la solution, conformément aux lois de l'équilibre, et qu'il suffit de mettre en présence une solution contenant deux moles d'acide et un équivalent de résine pour fixer une mole d'acide dans la phase insoluble, c'est à dire pour saturer tous les sites.

Il semble donc que si les cinétiques de fixation des deux isomères pris séparément conduisent à prévoir une distinction par le polymère entre ces deux stéréoisomères, cette dernière n'existe pas en fait lorsque la résine se trouve en présence d'une solution contenant simultanément les deux formes optiquement actives de l'acide malique. Nous avons vérifié que cette conclusion restait valable dans le cas de l'autre hydroxyacide choisi comme exemple, l'acide tartrique pour lequel tous les essais de fixation effectués permettent de conclure à l'identité des quantités d'énantiomères présentes dans la phase solide (les différences enregistrées n'excèdent jamais 0,5 μ mole/meq de résine, ce qui est inférieur à la fourchette d'erreur sur les résultats expérimentaux) quelques unes des valeurs expérimentales obtenues sont

Solution départ 0,508 mmole d
0,492 mmole l

$\frac{(d\ mal)}{(l\ mal)} = 1,03$

$\tau = \frac{\text{mmoles mal.}}{\text{meq rés.}}$		pH	Solution		Résine		$K = \left(\frac{l\ mal}{d\ mal}\right)_{rés.} \times \left(\frac{d\ mal}{l\ mal}\right)_{sol.}$	Solution d - l mmoles
			d mal mmoles	l mal mmoles	d mal mmoles	l mal mmoles		
1	1ère ad.	2,59	0,264	0,246	0,244	0,246	1,02 x 1,07 = 1,09	0,018
	2ème ad.	2,39	0,462	0,434	0,290	0,304	1,05 x 1,06 = 1,11	0,028
	3ème ad.	2,39	0,508	0,492	0,290	0,304	1,05 x 1,03 = 1,08	0,016
1	1ère ad.	5,53	0,018	0,002	0,490	0,090	1 x 9 = 9	0,016
0,2	1ère ad.	3,72	0,012	0,006	0,089	0,092	1,03 x 2 = 2,06	0,006
	2ème ad.	3,40	0,011	0,005	0,179	0,185	1,03 x 2,2 = 2,26	0,006
	3ème ad.	2,69	0,029	0,025	0,251	0,258	1,03 x 1,16 = 1,95	0,004
	4ème ad.	2,49	0,056	0,052	0,296	0,304	1,03 x 1,18 = 1,11	0,004
	5ème ad.	2,39	0,080	0,076	0,317	0,326	1,03 x 1,05 = 1,08	0,004

Tableau I - 10.

Fixation d'acide malique racémique sur résine PSD

pour différents rapports $\frac{\text{mmoles mal}_{sol}}{C_{th}}$.

et divers échantillons

Echantillon / $\frac{\text{Mal mmoles}}{C_{th}\ \text{meq.}}$		1	2	3	4
2	1	0,93	0,94	0,96	0,80
(Mal) S init.=0,2M	2	0,08	0,07	0,07	0,16
total		1,01	1,01	1,03	0,96
1	1	0,61	0,62	0,62	0,54
(Mal) S init.=0,1M	2	0,12	0,05	0,09	0,12
total		0,73	0,67	0,71	0,66
0,5	1	0,36	0,35	0,38	
(Mal) S init. = 0,1M	2	0,10	0,10	0,07	
	3	0,02	0,01	0,01	
total		0,48	0,46	0,46	
0,625	1	0,58	0,58	0,57	0,57
(Mal) S init. = 0,05M	2	0,29	0,27	0,28	0,27
total		0,87	0,85	0,85	0,84

Tableau I - 11.

consignées dans le tableau I. 12. Elles correspondent à un rapport $\frac{\text{tart. mmoles}}{C_{th}}$ de 0,5, et ne concernent que la première addition d'acide sur la résine entièrement sous forme base libre.

Ce tableau met en outre en évidence l'influence surprenante du pH sur la facilité de fixation de l'acide tartrique ; en effet, suivant la valeur du pH de la solution, l'acide existe majoritairement sous forme $HO_2C - CHOH - CHOH - CO_2^-$ ($pK_1 < pH < pK_2$) ou $^-O_2C - CHOH - CHOH - CO_2^-$ ($pH > pK_2$).

temps de contact	pH	Solution			Résine			K_L^D	Quantité tot. d'acide fixé
		d	l	d/l	d	l	d/l		
0		249	251						
15'	3,10	54	56	0,96	195	195	1	1,04	78%
1h.	3,10	17,5	19	0,92	231,5	232	1	1,08	93%
1h.	4,5	61,7	64,3	0,96	187,3	186,8	1	1,04	75%
1h.	4,8	183	184,5	0,99	66	66,5	0,99	1	
1h.	5,15	234,1	236,5	0,99	14,9	14,5	1,03	1,02	6%

Tableau I - 12.

Fixation d'acide tartrique racémique sur la résine PSD. Influence du temps de contact et du pH sur la quantité d'acide fixée. Quantités d'acides exprimées en μ moles. Solution d'acide dl initiale 10^{-1} N : 0,1 mmole d'acide en présence d'1 meq de résine.

Comme par ailleurs l'amine en contact avec la solution est uniquement sous forme $RR'\overset{+}{N}H_2$ aux pH considérés tous très inférieurs à son pK, on peut à priori penser que les ions tartriques se fixeront d'autant plus facilement sur la résine qu'ils sont plus chargés négativement. Or on observe un phénomène exactement inverse, la fixation est bien meilleure à pH 3,10 ($< pK_1 = 3,2$) qu'à pH 4,5

compris entre les 2 pK (pK_2 = 4,8) et dès qu'on atteint pH = pK_2 , les possibilités de fixation de l'acide tartrique sur la résine s'effondrent presque totalement.

Il semble donc que l'attraction électrostatique entre particules portant des charges de signe contraire ne soit pas la cause principale de la fixation d'acide tartrique sur la résine.

Ce comportement apparaît d'ailleurs comme particulier à l'acide tartrique puisque si l'on examine le tableau I. 11 relatif à la fixation de l'acide malique (pK_1 = 3,4 et pK_2 = 5,10), on s'aperçoit que, pour une même valeur de τ, seulement 50% du malate est fixé lors de la première addition à pH 2,6 < pK_1 , alors que 98% du malate total passe dans la phase solide à pH = 5,5 > pK_2 ; pour une autre valeur de τ avec pH = 3,7 compris entre pK_1 et pK_2 la répartition du malate est 90% - 10% entre les phases solide et liquide.

En conclusion de ces essais, on peut donc dire que l'amine fixée sur matrice solide ne fait preuve d'aucune sélectivité vis à vis des inverses optiques d'un hydroxyacide présent en solution sous forme racémique. Ce résultat est en contradiction avec ceux obtenus aussi bien lors de constructions de courbes de neutralisation que lors de l'étude en solution. Cette contradiction peut s'expliquer par un effet cinétique dans le premier cas et par l'existence d'un degré de liberté inférieur pour l'amine fixée par rapport à l'amine en solution dans le second cas.

Là encore le comportement de l'acide tartrique apparaît beaucoup plus difficile à expliquer que celui de l'acide malique.

Il ne semble toutefois pas que cette série d'essais infructueux élimine à priori la possibilité d'une séparation à l'élution, tout au moins dans le cas de l'acide malique. En effet, pour celui-ci, la liaison ionique entre fonction amine et ion acide qui semble responsable de la fixation d'acide a les mêmes chances de formation pour l'un

ou l'autre des deux énantiomères qui se fixeront donc en quantité équivalente lorsqu'ils sont en compétition.

On peut concevoir que c'est seulement ensuite que des liaisons secondaires faibles, qui, étant données les structures des molécules en présence pourraient par exemple être des liaisons hydrogène , se formeront préférentiellement entre la résine et uniquement l'un des deux isomères par suite des différences de configuration ; ces liaisons secondaires seront alors responsables d'une meilleure rétention de l'énantiomère impliqué.

I - 2.4. Elution préférentielle d'un énantiomère.

Nous venons de voir que, s'il est difficile de fixer sélectivement un énantiomère sur la résine, il est par contre facile d'y fixer le racémique en quantité très proche des conditions de saturation de l'échangeur, tout au moins dans le cas de l'acide malique. Ceci étant réalisé, nous avons donc essayé de procéder à une élution sélective à l'aide d'une solution $\frac{N}{5}$ $CH_3CO_2^-/CH_3CO_2H$ 95% - 5% permettant de maintenir le pH en solution aux environs de 5,8.

I - 2.4. 1). Elution préférentielle de D ou L malate. La saturation de la résine en ions dl maliques est réalisée par contacts successifs avec une solution malique de pH $\sim$ 5,8, le rapport $\frac{\text{mmoles maliques}}{C_{th}}$ étant égal à 2.

En trois contacts de 24 heures, la saturation qui varie légèrement suivant les essais est toujours au moins égale à 90% et peut atteindre 100%.

Dans un premier stade de l'expérimentation, nous avons déterminé l'influence du temps de contact d'une solution acétique pH 5,8 sur la quantité globale d'ions maliques élués. Pour des temps de contact de 15, 30 et 60 minutes, il est possible de tracer les courbes moyennes présentées sur le graphique I. 7, où nous avons représenté les valeurs extrêmes obtenues au cours de toute une série de déterminations, afin d'avoir une idée de l'indétermination sur les mesures.

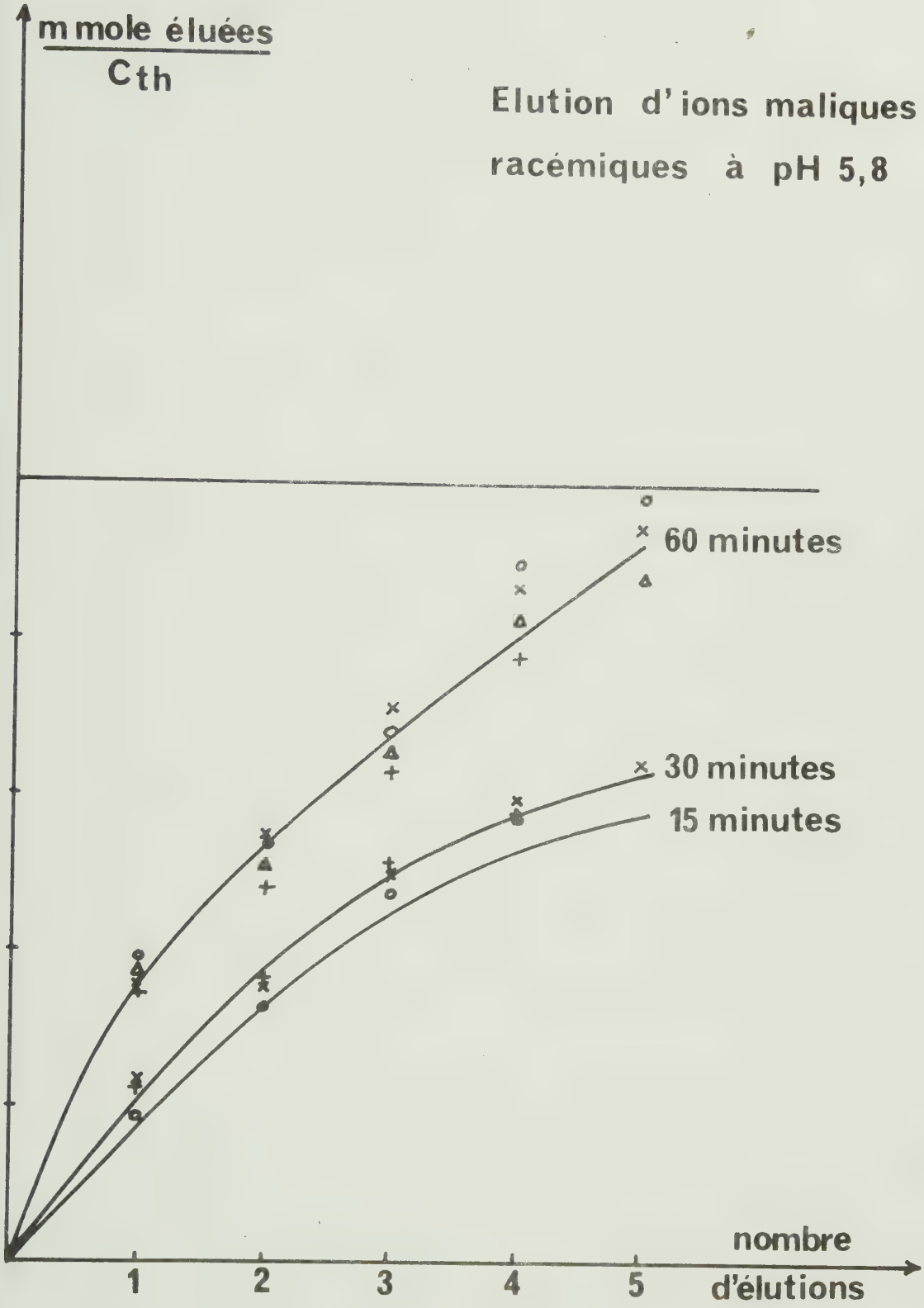

m mole éluées
Cth
Elution d'ions maliques
racémiques à pH 5,8
60 minutes
30 minutes
15 minutes
nombre
d'élutions
1
2
3
4
5

Fig I. 7

On voit que la quantité éluée augmente avec le temps de contact, ce qui est évident à priori puisque même au bout d'une heure l'état d'équilibre de distribution des ions entre la résine et la solution est loin d'être atteint. Il semble toutefois qu'on n'aura pas intérêt à trop augmenter le temps de contact, car l'incertitude sur les quantités d'acide éluées augmente elle aussi.

En cinq élutions, environ les 2/3 des moles d'acide malique fixées sur la résine sont passées en solution pour des contacts d'une heure.

Pour des temps de contact de 15 et 30 minutes, la polarimétrie en presence de paramolybdate d'ammonium permet de mettre en évidence l'existence d'un excès de forme D malique dans toutes les fractions éluées sans exception (tableaux I. 13 et I. 14). La résine s'appauvrit donc beaucoup plus rapidement en énantiomère D, ce que démontrent les valeurs des coefficients d'échange sélectifs K_D^L toujours nettement supérieurs à 1 et du même ordre de grandeur que ceux calculés à partir des courbes de neutralisation.

Nous avons dans chaque tableau donné les résultats correspondants à 5 essais différents s'écartant le plus des valeurs moyennes afin d'illustrer, là encore, l'importance de l'indétermination sur les mesures effectuées.

Pour un temps de contact de 60', une précipitation intervenant lors de l'addition de paramolybdate d'ammonium élimine toute possibilité d'évaluation du coefficient d'échange sélectif. Mais l'examen des résultats obtenus en 15 et 30 minutes de contact semble montrer qu'il n'y a aucun intérêt à augmenter le temps de contact, la répartition des énantiomères D et L n'étant pas meilleure au bout de 30 minutes qu'au bout de 15 minutes.

Le fait de prolonger le temps d'élution augmente donc la concentration de chaque énantiomère mais ne modifie pratiquement pas le taux d'enrichissement en isomère D malique dans la solution.

Les valeurs calculées pour les coefficients d'échange sélectif, toutes supérieures à 1 vont toujours dans le sens de l'existence d'une association préférentielle D amine - L acide dans le cas de l'acide malique.

Il n'est malheureusement pas possible de s'assurer que les quantités d'isomère D ou L restant sur la résine sont bien celles calculées dans les tableaux I. 13 et I. 14 et en effet, au-delà de la 5ème dilution, le mélange acétate-acide acétique 95-5 utilisé comme éluant ne permet plus d'extraire les ions maliques restant encore fixés sur la résine. Il devient alors nécessaire d'utiliser la haute affinité de la résine pour les ions chlorure afin de réaliser un échange chlorure-malate. Mais on se trouve alors en présence de solution contenant un mélange d'ions malate et chlorure et nous avons vu précédemment, lors des essais effectués sur une résine sous forme chlorhydrate, que toute addition de paramolybdate dans une telle solution entraîne une précipitation immédiate ; le dosage polarimétrique, qui seul permettrait de mettre en évidence l'excès de forme L restant sur la résine, devient donc impossible.

L'échange chlorure-malate permet donc seulement de vérifier que la totalité des ions maliques restée sur la résine après élution en milieu acétate peut être récupérée (dosage du malate total par oxydation → Annexe II) ; on la retrouve bien à ± 5% près.

Pour avoir une confirmation des résultats présentés ci-dessus, nous avons repris une série d'essais en parallèle sur des échantillons de résine provenant de préparations différentes et qui se distinguent les uns des autres, d'une part par le taux de pontage au divinyl benzène, d'autre part par la nature de l'amine fixée.

Elution d'acide DL malique par une solution $\frac{N}{5}$ d'acétate/acide acétique 95% - 5% pH 5,8 - Contacts 15 minutes.

Quantité de résine : 1 équivalent - Quantités d'acide exprimées en milliéquivalents.

	Solution D	Solution L	Résine $\bar{D}$	Résine $\bar{L}$	$\frac{D}{L} \times \frac{\bar{L}}{\bar{D}} = K_D^L$			moyenne
Acide fixé	-	-	500meq	500meq				
1ère élution	93	57	407	443	1,63	1,09	1,8	
	110	45	390	455	2,44	1,67	4	2,5
	102	48	398	452	2,12	1,13	2,4	
	98	57	402	443	1,72	1,10	1,9	
2ème élution	104	56	303	387	1,86	1,28	2,4	
	104	56	286	399	1,86	1,40	2,6	2,8
	124	46	274	406	2,70	1,48	4	
	108	62	294	381	1,74	1,30	2,3	
3ème élution	100	60	203	327	1,67	1,61	2,7	
	108	69	178	330	1,56	1,85	2,9	5,3
	110	25	164	381	4,4	2,32	10,2	
	131	49	163	332	2,67	2,03	5,4	
4ème élution	50	25	153	302	2	1,97	3,9	
	66	24	112	306	2,75	2,73	7,5	
	42	13	122	368	3,23	3,02	9,8	
	53	12	110	320	4,42	2,91	12,8	
5ème élution	43	7	110	295	6,14	2,68	16,4	
	47	8	65	298	5,87	4,58	26,9	
	33	13	89	355	2,54	3,99	10,1	
	5	5	6	315	10	5,25	52	

Tableau I. 13.

Elution d'acide DL malique fixé sur résine D aminée

Temps d'élution : 30 minutes

	Solution D	Solution L	Résine D	Résine L	K_D^L	moyenne
Acide fixé			500meq	500meq		
1ère élution	160	75	340	425	2,6	2,6
	165	70	335	430	3,1	
	160	65	340	435	3,2	
	120	72	380	468	2,1	
2ème élution	80	40	260	385	2,9	3,1
	82	38	253	392	3,2	
	108	32	232	403	5,8	
	97	41	283	425	3,3	
3ème élution	100	40	160	345	5,4	5
	70	45	183	347	3	
	115	30	117	373	12,2	
	108	37	175	390	6,4	
4ème élution	53	37	107	308	4	4
	46	29	137	318	3,7	
	41	24	76	349	7,8	
	58	37	117	353	4,7	
5ème élution	40	15	67	293	11,7	trop dispersés.
	36	4	101	314	28,1	
	40	10	26	339	52	
	42	28	75	325	6,4	

Tableau I. 14.

Il nous a, en effet, semblé que si les résultats précédents sont reproductibles lorsqu'on passe d'un échantillon à un autre qui renferme le même isomère de la désoxyéphédrine, il y aura une bonne confirmation de l'existence d'une association préférentielle D amine - L acide.

Si de plus, des essais effectués sur deux échantillons renfermant l'autre isomère de l'amine - la L désoxyéphédrine - font apparaître une association préférentielle L amine - D acide, il semble alors qu'il ne puisse plus y avoir de doute sur la formation de complexe plus stable entre l'amine et l'acide de configurations inverses.

Les résultats des expériences réalisées sont présentés dans le tableau I. 15.

Nous n'avons pas calculé les coefficients d'échange sélectif car nous avons porté dans ce tableau les quantités d'ions D et L maliques totales élués en trois fois et les quantités de ces mêmes ions présents sur la résine après ces trois élutions. Un calcul des K_L^D serait donc sans signification. Pour avoir un point de comparaison, nous avons porté dans ce même tableau les quantités totales d'ions élués lors des cinq élutions successives intervenues dans l'expérience précédente sur quatre échantillons de résine provenant d'une même préparation. L'examen de ce tableau met bien en évidence que, pour toutes les résines contenant l'amine D, le mélange acétate-acide acétique permet d'éluer plus d'ions D malique que L malique, la solution obtenue pouvant atteindre un degré de pureté optique de 85% en forme D dans le cas le plus favorable.

Les deux échantillons de polystyrène sur lesquels est fixée la L amine conduisent au contraire à l'obtention d'un éluat plus riche en ions L malique, ce qui prouve que ces derniers sont moins solidement fixés sur la résine que leurs énantiomères. Il faut d'ailleurs remarquer que la pureté optique des solutions L maliques est inférieure

à celle des solutions D maliques, comme la différence de pureté des amines fixées pouvait le laisser prévoir. Nous avons vu en effet, lors de l'étude en solution que la L amine préparée présentait un degré de pureté optique de 80% seulement contrairement à la D amine qu'il est possible d'obtenir pratiquement pure.

Echantillon	Résine			Solution		
	l µ moles	d µ moles	l/d	d µ moles	l µ moles	d/l
1,1 D	438	161	2,7	339	62	5,5
1,1 L	236	366	0,64	134	264	0,51
3,8 D	439	132	3,3	367	60	6,1
3,8 L	246	325	0,76	175	254	0,69
Essais du tableau I.13 sur résine D	295	110	2,7	390	205	1,90
	298	65	4,6	435	202	2,15
	355	89	4	411	145	2,8
	315	6	52	494	185	2,7

Tableau I - 15.

Elution à pH 5,9 de 500 µ moles de d malate et 500 µ moles de l malate fixées sur 1 meq de résine.

Au-delà de cinq élutions, la quantité totale d'ions maliques passant en solution devient très faible et également répartie entre les deux énantiomères puis nulle. Il n'y a donc aucun intérêt à poursuivre une élution qui ne permet pas d'augmenter la pureté optique de la solution globale obtenue mais qui entraîne une augmentation de la dilution ; or les solutions obtenues sont déjà relativement diluées : de l'ordre de 10 à 15 mmoles l^{-1} en malate total.

L'ensemble des essais effectués sur l'acide malique

permet donc de conclure à l'existence à peu près certaine d'une association amine-acide de configurations inverses préférentielle par rapport à l'association amine-acide de même configuration.

I - 2.4. 2). Elution préférentielle de D ou L tartrate. Avant de clore ce chapitre, et bien que le comportement de l'acide tartrique soit en général plus difficile à interpréter, nous allons présenter quelques essais d'élution réalisés sur résine PSD saturée en acide tartrique racémique afin de s'assurer que la continuité des résultats obtenus en solution, ou lorsque l'amine est fixée sur matrice insoluble se retrouve bien encore sur ce deuxième hydroxy-acide en C_4.

Nous rapportons, dans le tableau I. 16, les résultats obtenus pour 4 élutions successives par une solution acétate pH 5,8 effectuées en parallèle sur 3 échantillons différents de la même résine, saturés en tartrate racémique. On voit que, si la variation de la quantité globale de tartrate est assez grande, pour une même élution, d'un essai à l'autre (de 380 à 470 μ moles en solution pour la première élution) il n'en est pas de même du rapport des quantités de chaque diastéréoisomère élué ou restant sur la résine. Ce rapport est même remarquablement constant pour chaque élution lorsqu'on passe d'un échantillon à l'autre (on ne remarque qu'une exception lors de la troisième élution pour l'essai 2) ; la valeur du rapport $\frac{\text{L tart.}}{\text{D tart.}}$ en solution est légèrement supérieure à l'unité pour les premières élutions et tend ensuite vers 1 ; il y a donc une rétention de L tartrate inférieure à la rétention de D tartrate sur la résine, ce qui met en évidence l'existence d'une association D amine - insolubilisée - D tartrate plus solide que l'association D amine L tartrate et confirme donc bien les résultats obtenus précédemment.

Essai	Elution	Résine			Solution			K_L^D
		D	L	D/L	D	L	L/D	
	0	∿500	∿500					
1	1	253	241	1,05	210	223	1,06	1,11
2		314	306	1,03	186	194	1,04	1,07
3		273	258	1,06	227	241	1,06	1,12
1	2	133	91	1,4	120	150	1,25	1,75
2		183	129	1,4	131	177	1,35	1,9
3		144	97	1,5	129	161	1,25	1,9
1	3	93	51	1,8	40	40	1	1,8
2		74	3	24,7	109	126	1,15	28,4
3		101	56	2,8	43	41	0,95	1,7
1	4	83	41	2	10	10	1	2
2		74						
3		80	35	2,3	21	21	1	2,3

Tableau I - 16.

Elution d'acide tartrique DL fixé sur résine PSD. Quantités d'ions D et L exprimées en μ moles/m équivalent de résine. Quantité de solution éluante : 10 cm^3 par meq. de résine ; contact résine-solution : 1 heure pour chaque élution. pH solution éluante 5,8.

I - 3. Conclusion et application à l'étude en colonne de résine.

Il semble donc établi, aussi bien par les quelques essais en solution que par l'ensemble des expériences sur résine, qu'il y ait formation d'association entre un énantiomère de l'amine et l'un ou l'autre des inverses optiques de l'acide légèrement plus stable dans un cas que dans l'autre : lorsque les carbones asymétriques de l'amine et de l'acide sont de configuration inverse dans le cas de l'acide malique de même configuration dans le cas de l'acide tartrique. Les divers

essais statiques ont démontré que la différence de stabilité de ces associations ne se manifeste pas toujours également lorsque les conditions expérimentales varient.

A la fixation, seules les courbes de neutralisation et l'échange chlorure-malate font apparaître une différenciation lors du calcul des coefficients d'échange sélectif K^L_D ou K^L_{DL} suivant les cas. Il faut remarquer que ces coefficients sont calculés à partir de deux expériences distinctes à chaque fois, c'est à dire dans lesquelles les formes intervenant dans le calcul de K n'entrent pas en compétition. Les deux énantiomères acides se fixent donc indépendamment l'un de l'autre sur la résine, suivant leur propre cinétique sans subir d'influence mutuelle dans le cas des courbes de neutralisation. Or on sait que les cinétiques de fixation des deux énantiomères acides étudiés séparément sont différentes, celle du racémique étant intermédiaire (figure I. 6). Lorsqu'on passe aux essais de fixation du racémique sur résine amine base libre, les deux inverses optiques D et L entrent alors en compétition et l'expérience prouve que la résine ne fait plus aucune distinction entre les deux qui se fixent en quantités égales. On peut donc supposer que la cinétique de fixation de chaque énantiomère est influencée par la présence de l'autre dans le même milieu ; le plus rapide des deux inverses optiques entraîne l'autre dont la cinétique se trouve accélérée tandis que la sienne est ralentie, si bien que les deux pénètrent également dans la résine avec une vitesse qui est la moyenne des deux vitesses de chaque stéréoisomère pur.

Donc, dans le cas où l'un des deux protagonistes intervenant dans l'association est immobilisé dans une phase insoluble, il semble que les différences enregistrées à partir d'expériences séparées sur chaque énantiomère soient uniquement d'ordre cinétique et reflètent une difficulté d'approche du site de fixation variable suivant l'isomère considéré ; lorsqu'ils entrent en compétition, les deux inverses optiques

s'influencent mutuellement ce qui se traduit par une aptitude égale à former des associations.

En solution, il semble qu'il y ait association dans un cas et pas dans l'autre, que l'on considère séparément chaque couple acide amine ou le cas où le racémique acide est mis en présence d'un énantiomère d'amine. Du point de vue pouvoir rotatoire, la solution racémique plus amine se comporte comme la somme des deux solutions séparées de chaque inverse optique de l'acide pris à la même concentration que dans le racémique. Il existerait donc en solution une distinction par une désoxyéphédrine optiquement pure donnée entre les deux énantiomères acides. Mais il faut remarquer que les deux cas, étude en solution et sur résine, se différencient totalement par les conditions de milieu.

En solution, la mobilité des ions amine et acide est grande et le pouvoir dissociant du milieu solvant entraînera une rupture d'à peu près toutes les liaisons ioniques amine-acide dans les conditions de dilution considérées. Si donc il existe en solution une association amine-acide, ce ne pourra être que par suite de l'existence de liaisons autres que la liaison ionique, lesquelles deviendront déterminantes.

Dans le cas des résines, l'association se forme dans la phase insoluble sur laquelle est immobilisée l'amine, c'est à dire en milieu peu dissociant ; on peut alors supposer que la liaison ionique deviendra la cause prépondérante d'association et comme elle se forme avec une égale facilité quelque soit l'isomère acide considéré ; il n'y aura pas de différenciation possible à l'association.

Lorsque les deux molécules acide et amine sont ainsi liées ioniquement l'une à l'autre, leur mobilité relative est réduite à une possibilité de rotation autour de l'axe de liaison qui peut même être gênée dans certains cas par l'environnement rigide formé par la matrice insoluble. On peut donc concevoir que, s'il existe d'autres possibilités de faibles liaisons entre les deux entités acide et amine qui

sont potentiellement les mêmes quels que soient les énantiomères en présence, la position relative des groupements intervenant dans ces liaisons deviendra déterminante, la liaison ne pouvant avoir lieu que si les groupes réactifs impliqués peuvent se placer en position relative favorable. Il se pourra donc qu'il y ait dans un cas plus de liaisons possibles que dans l'autre, l'association correspondante étant évidemment plus solide. Lors d'une élution ultérieure, on conçoit que l'association comportant le moins grand nombre de liaisons soit détruite majoritairement et qu'en conséquence l'un des énantiomères repasse en solution en plus grande quantité que l'autre. C'est ce qui s'est effectivement produit dans les essais d'élutions statiques effectués au cours de ce travail.

Du point de vue énergétique, les énergies de liaisons assurant la cohésion des associations après que la liaison ionique se soit formée sont très faibles. La différence d'enthalpie libre entre les deux types d'associations D-D et D-L (ou L-L et L-D) sera donc elle-même peu importante ainsi que leur différence de stabilité.

L'étape suivante de nos investigations consistait à transposer les résultats acquis lors des essais statiques à des essais dynamiques en colonne si possible en les améliorant afin d'aboutir à une séparation effective et non plus simplement à un enrichissement de la solution effluente. Malheureusement le passage en colonne ne nous a pas permis d'améliorer les résultats précédents et nous n'avons jamais abouti à des enrichissements supérieurs à ceux obtenus lors des expériences qui viennent d'être présentées, c'est pourquoi nous ne donnerons pas ici des valeurs numériques qui n'ajouteraient rien aux résultats antérieurs. Nous allons par contre discuter du choix des méthodes et des causes possibles d'échec.

Parmi les méthodes de séparation sur colonne d'échangeur d'ions habituellement utilisées, l'une est à priori à rejeter ici :

c'est l'analyse frontale basée sur des possibilités de séparation lors de la fixation du mélange sur la résine, lesquelles sont nulles dans le cas présent ; cette méthode n'est d'ailleurs valable que lorsque le coefficient d'échange sélectif K_B^A des deux ions à séparer est suffisamment grand, ce qui n'est pas vérifié pour les énantiomères étudiés ici.

On peut encore déposer en haut d'une colonne une petite quantité du mélange à résoudre et effectuer son développement soit par élution soit par déplacement ; l'élution est en général utilisée à des fins analytiques lorsqu'on dispose de petites quantités de produits que l'on veut séparer avec un bon rendement ce qui est notre cas ; le déplacement est au contraire employé lorsqu'on veut séparer de grandes quantités de produits sans que le rendement soit nécessairement très grand. La première de ces deux techniques semble seule adaptée à notre problème et c'est donc celle que nous avons choisie.

Nous avons introduit dans une colonne de diamètre 1 cm^2 , 20 meq de résine PS 3,8 D sous forme base libre, environ 30 cm de hauteur de résine. Au sommet de la colonne nous avons déposé 1 mmole de malate racémique et après un contact prolongé de manière à ce que tout le malate se fixe sur la résine, nous avons élué à l'aide d'une solution d'acétate pH 5,8 ou 4,8 ou à l'aide d'une solution de soude $\frac{N}{10}$, toutes conditions qui assurent le passage de la résine sous forme base libre après la bande de malate ; on est donc bien dans les conditions d'un déplacement par élution, la bande déplacée se trouvant entre deux résines sous même forme (base libre) . Dans le meilleur des cas (expérience à pH 4,8), nous avons récupéré une première fraction contenant 60% d'énantiomère D et 40% d'énantiomère L, il s'agit d'une fraction de tête contenant 10% du malate total introduit ; dans les fractions suivantes le rapport L/D devient moins bon puis s'inverse ; l'enrichissement est donc limité aussi bien en pureté qu'en rendement. Pour essayer de clarifier les choses nous avons reconstitué statiquement le comportement en colonne au niveau de trois tranches de résine en plaçant dans trois ampoules des quantités

équivalentes de résine base libre (soit deux meq par ampoule) (figure I - 8.) Dans la première ampoule on sature la résine en malate racémique ce qui correspond à la bande de malate déposée en haut de la colonne. On élue ensuite par contacts successifs de 15 minutes avec 20 ml d'acétate $\frac{N}{10}$ pH 4,8. Chacun des trois éluats recueillis est passé successivement dans une ampoule contenant au départ de la résine base libre (bande de résine suivant immédiatement la bande malate dans la colonne) ; les éluats recueillis à la sortie de cette deuxième ampoule sont passés à leur tour sur une troisième fraction de résine initialement base libre. Tous les contacts sont de 15 minutes et sans agitation.

L'examen des résultats obtenus présentés au tableau I. 17, montre qu'un échange s'établit en 15 minutes au niveau de la première ampoule mais les solutions effluentes ne sont pas modifiées lorsqu'on les met au contact de fractions de résine base libre ; on retrouve donc en bas de la colonne la solution correspondant à l'échange au niveau de la bande initiale ce qui explique que les résultats en colonne ne soient pas améliorés par rapport à ceux obtenus en essais statiques.

Deux phénomènes semblent être essentiellement responsables de cet échec :

- d'une part la lenteur des cinétiques d'échange ; en effet au cours d'un écoulement même lent (12 ml h^{-1}) les temps de contact d'une solution donnée avec un plateau de résine, sont plus courts qu'en essai statique et on peut concevoir que l'échange n'ait pas le temps de se faire en proportion suffisante.

- d'autre part l'absence d'agitation dans les essais en colonne. En effet, tous les essais statiques (autre que le dernier destiné à reproduire ce qui se passe en colonne) ont été réalisés en présence d'un brassage énergique du mélange résine-solution. La diffusion des ions aussi bien en solution qu'à l'interface grain de résine-solution est alors grandement améliorée de même que l'accessibilité aux sites réactifs de la résine.

SCHÉMA DE RECONSTITUTION STATIQUE D'UNE ÉLUTION EN COLONNE

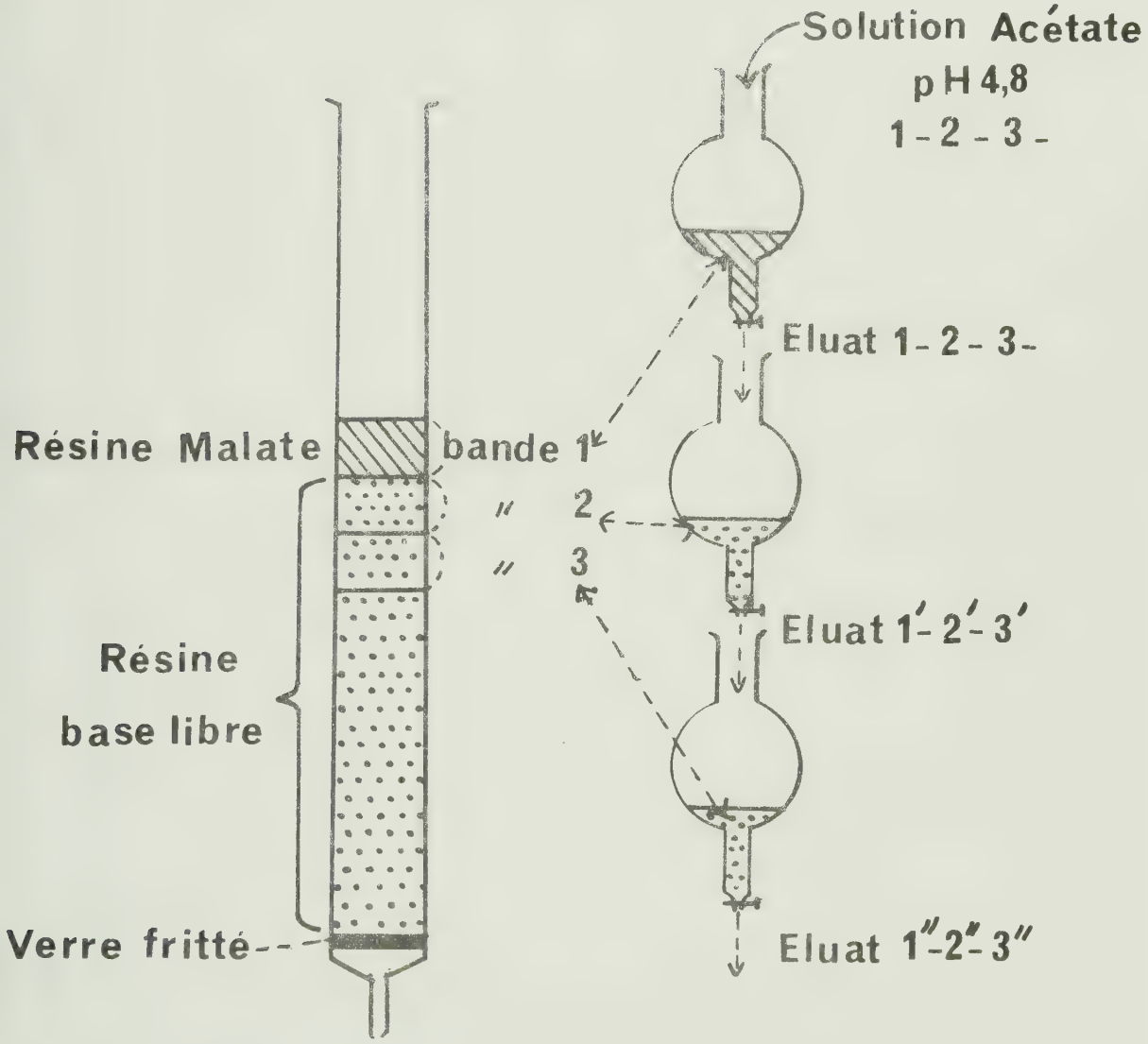


Fig. I.8

	Ampoule	Elution	pH	Solution mmoles D	Solution mmoles L	Résine mmoles D	Résine mmoles L	K_D^L app.
ESSAI I	1	0		—	—	500	500	
		1	4,9	76	44	424	456	1,86
		2	4,8	82	68	342	388	1,36
		3	4,9	80	50	262	338	2,06
	2							
		1'	4,85	65	40	11	4	0,62
		2'	4,85	82	68	11	4	0,41
		3'	4,90	80	50	11	4	0,60
	3							
		1"	4,85	65	40	0	0	
		2"	4,85	82	68	0	0	
		3"	4,90	80	50	0	0	
ESSAI II	1	0	—	—	—	500	500	
		1	4,9	76	54	524	446	1,48
		2	4,9	78	57	346	389	1,53
		3	4,9	74	52	272	337	1,77
	2							
		1'		48	28	28	26	1,31
		2'		78	57	28	26	1,27
		3'		74	52	28	26	1,32
	3							
		1"		48	28	0	0	
		2"		78	57	0	0	
		3"		74	52	0	0	

Il y a donc deux effets qui vont dans le même sens et ont par conséquence la non modification des solutions de malate relativement diluées issues de la première couche de résine initialement saturée en malate racémique.

Il ne semble donc pas que notre résine permette, plus que les autres systèmes étudiés par d'autres chercheurs, d'effectuer une séparation satisfaisante d'énantiomères d'hydroxyacides succiniques. Par contre il est possible d'obtenir un enrichissement en un énantiomère par des essais statiques mais d'une part l'enrichissement reste limité à quelques %, d'autre part cette technique ne peut concerner que de très petites quantités de solutions.

CHAPITRE II.

UTILISATION D'ENZYMES INSOLUBILISEES

COMME AGENTS DE SEPARATION D'ENANTIOMERES

II - 1. Utilisation de la stéréospécificité de l'enzyme vis à vis de son substrat.

II - 1.1. Introduction.

On sait que les enzymes sont des catalyseurs très spécifiques d'une réaction déterminée et, parfois même, d'un seul substrat. Cette haute spécificité s'explique par la nécessité d'établissement de points de contact entre site enzymatique et substrat lors de la formation du complexe enzyme substrat. Or, le site enzymatique est une partie d'une molécule protéique dont les possibilités de déformations, indispensables pour qu'il y ait adaptation au substrat, sont limitées. On conçoit donc que la configuration moléculaire de ce dernier ait une grande importance et que, dans le cas de molécules à centre d'asymétrie, l'enzyme puisse s'adapter à un énantiomère et pas à l'autre.

Tel est le cas, par exemple de la glucose oxydase qui catalyse l'oxydation en gluconolactone du D glucose mais non du L glucose, de la malate déshydrogénase qui permet l'oxydation du L malate en oxaloacétate mais non du D malate, des D amino-acides oxydases qui interviennent dans la transformation des D aminoacides en acides α cétoniques tandis que les L aminoacides ne subissent pas d'oxydation désaminante dans les mêmes conditions.

Partant d'un mélange racémique, il sera donc possible en présence de l'enzyme convenable et dans des conditions expérimentales données de transformer l'un des isomères optiques, l'autre restant inattaqué ; il deviendra alors facile d'effectuer la séparation des deux composés chimiquement différents et d'isoler l'un des énantiomères.

Cette méthode a été appliquée en solution par différents chercheurs essentiellement pour des séparations d'amino-acides ; Schmitt et Zenk utilisent l'enzyme E C 2-3-1 acétyl CoA-Daminoacide N acétyl transférase pour effectuer l'acétylation stéréospécifique des D amino-acides contenus dans un racémique ce qui leur permet d'isoler l'énantiomère L avec un excellent rendement au bout de plusieurs cycles racémisation-réaction enzymatique. De même Kudo Shiro et Hisaya Hironori décrivent l'hydrolyse asymétrique de DL aminoacides N acylés par les enzymes de bactéries streptomyces ; ils isolent ainsi l'antipode L de divers acides aminés (ϕalanine, ϕsérine, valine méthionine, tryptophane). Hiramoto Minoru (65bis) fait suivre l'action de la papaïne (peptidase) d'une séparation entre 2 phases liquides et sépare la D alanine de la L alanine en partant de la N phtaloyl alanine racémique. Mais si cette méthode offre des possibilités de séparation certaines, elle présente l'inconvénient d'entrainer la transformation de l'un des isomères optiques sans qu'il soit toujours possible de le régénérer par la réaction inverse et les opérations de séparation restent souvent assez longues.

De plus, chaque expérience de séparation met en oeuvre une certaine quantité d'enzyme qu'il n'est pas possible de récupérer pour la réutiliser lors d'un nouvel essai. Or pour la plupart des systèmes enzymatiques, les difficultés d'isolement à partir de matériaux biologiques sont importantes et les préparations commerciales ont en conséquence un prix de revient élevé. Il s'ensuit que la méthode de séparation évoquée ci-dessus est elle-même fort onéreuse et ne peut être appliquée qu'à quelques essais de laboratoire et en aucun cas à une séparation de routine.

Mais, depuis quelques années diverses équipes de recherche se sont penchées sur le problème de l'insolubilisation des enzymes dans le but, entre autres, de pouvoir réutiliser plusieurs fois le même échantillon. Elles ont fait appel à différentes méthodes que l'on peut classer comme suit :

a) adsorption physique ou physicochimique sur échangeur d'ion (Grubhofer et al.) ou sur cellulose aminée (Tosa et al.)

b) inclusion dans un gel (Bauman et al. ; Hicks et al. ; Mosbach K. et R.) ou sur une membrane de collodion (Goldman et al.)

c) formation de liaisons covalente (Weetall H.) entre l'enzyme et un support qui peut être

- soit inorganique : billes de verre poreux (Weibel et al.), silice colloïdale ou alumine,
- soit organique : cellulose (Hornby et al. ; Mitz et al.), dérivés du polystyrène ou de l'acide métacrylique (Manecke et al. -a -d), copolymères éthylène anhydride maléique (Levin et al.)

d) réticulation de mélanges enzyme autre protéine à l'aide d'un agent pontant tel que le glutaraldéhyde (Avrameas et al. -a -b ; Sélégny et al. -a -b)

Les 2 premières méthodes présentent surtout un intérêt technique mais les 2 autres, qui font intervenir une liaison chimique enzyme-support au niveau d'un groupement extérieur au site enzymatique donc ne modifiant pas la conformation de celui-ci, conduisent à d'excellents résultats. L'insolubilisation s'accompagne généralement d'une augmentation de stabilité de l'enzyme dont elle ne modifie que très peu les propriétés. Le steckage et les conditions de mise en oeuvre sont donc facilités tandis que l'activité est en grande partie conservée.

Il nous a donc semblé intéressant de reprendre des essais de séparation d'énantiomères sur un tel matériel.

Nous avons utilisé la réticulation comme méthode d'insolubilisation, celle-ci ayant été mise au point par une équipe travaillant en collaboration avec la notre et ayant donné toute satisfaction dans le cas de la glucose oxydase qui nous intéresse ici. Le support protéique utilisé est l'albumine -humaine ou bovine suivant le cas-; après insolubilisation, l'activité de l'enzyme est conservée à 80% au moins ; il est simplement indispensable de contrôler la valeur du pH optimum avec plus de précision qu'en solution, la variation de l'activité en fonction du pH présentant un maximum beaucoup plus marqué

dans le cas d'enzyme fixé sur support solide (Brown et al.). On peut ainsi préparer soit des membranes de dialyse d'épaisseur variable soit des mousses dont on connaît l'activité enzymatique par cm^2 de membrane ou par g de mousse.

Dans le cas des mousses, on se trouve en présence d'un matériel dont l'utilisation pourra se faire en colonne dans des conditions de mise en oeuvre tout à fait semblables à celles réalisées avec les résines échangeuses d'ions. On n'utilisera plus l'enzyme comme catalyseur mais comme réactif intervenant en quantité stoechiométrique dans la formation d'un complexe.

En effet, une réaction enzymatique simple à cinétique Michaelienne, comporte 2 étapes successives :

- l'une de formation d'un complexe suivant une réaction réversible

$$E + S \underset{K_2}{\overset{K_1}{\rightleftharpoons}} ES$$

- l'autre de transformation du complexe

$$ES \xrightarrow{K_3} E + P$$

en une réaction pratiquement totale mais généralement plus lente que la précédente et qui impose donc sa vitesse à l'ensemble de la réaction.

Dans le cas de séparation d'isomères optiques qui nous préoccupe ici, il serait intéressant d'éviter la transformation en produit de l'isomère donnant lieu à la réaction enzymatique en choisissant des conditions expérimentales permettant de s'arrêter à la 1ère des 2 étapes précédentes

On pourrait alors retenir l'isomère substrat dans la phase solide sous forme d'un complexe ES et ceci en quantité d'autant plus grande que la mousse contiendrait plus de molécules d'enzyme ; on recueillerait une solution contenant la totalité de l'isomère ne formant pas de complexe enzymatique.

En modifiant les conditions expérimentales afin de déplacer ce même équilibre dans le sens de la destruction du complexe il y aurait peut-être une possibilité de retrouver en solution l'énantiomère sensible à l'enzyme non transformé.

Pour effectuer des essais dans ce sens, il nous a paru indispensable de choisir une enzyme

- dont la spécificité stéréoisomérique soit grande,
- dont le mécanisme réactionnel en solution soit connu avec une précision suffisante,
- dont la fixation sur support solide ait été étudiée en détails
- qu'il soit possible d'obtenir commercialement.

La glucose oxydase nous a paru satisfaire à l'ensemble de ces critères et c'est pourquoi nous l'avons choisie de préférence à une autre enzyme telle que, par exemple, la malate déshydrogénase à laquelle on aurait pu penser à priori car elle aurait permis de reprendre des essais sur les mêmes composés que précédemment. Cette dernière enzyme a été éliminée pour deux raisons :

- d'une part son insolubilisation n'a pas été étudiée à notre connaissance,
- d'autre part le D malate peut former un complexe avec l'enzyme, ce qui annule pratiquement toute chance de séparation de ces deux composés grâce à la malate déshydrogénase qui ne semble pas être stéréospécifique dans la 1ère phase de la réaction puisque

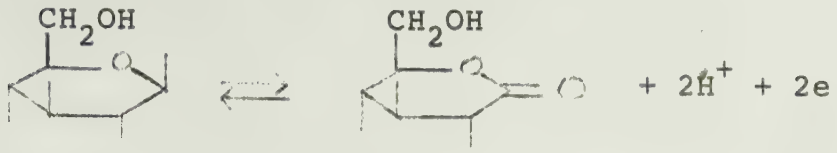
$$E + Lmal \rightleftharpoons E.Lmal$$

et $$E + Dmal \rightleftharpoons E.Dmal.$$

La distinction ne se fait que lorsque le complexe est formé et que seul $EL \longrightarrow E + P$.

La glucose oxydase catalyse spécifiquement l'oxydation du β D glucose en gluconolactone, elle ne permet pratiquement aucune autre oxydation de sucre, L glucose inclus. La réaction globale fait intervenir 2 couples rédox :

1°) β D glucose / D gluconolactone



dont le potentiel normal apparent à pH 7 est de - 360 mV,

2°) un système flavinique introduit dans le milieu réactionnel sous forme de glucose oxydase : la flavine est en effet liée à la partie protéique de l'enzyme par liaisons covalentes à raison de 2 FAD / mole d'enzyme.

L'étude du processus rédox intervenant a conduit Gibson et al. et Massey et al. à admettre que la réduction de la flavine est un processus direct à deux électrons

$$E.FAD + 2H^+ + 2e \longrightarrow EFADH_2$$

Ces auteurs fondent leur conclusion sur le raisonnement suivant : il est possible, partant de glucose oxydase sous forme oxydée, d'obtenir la semiquinone par réduction catalytique à l'hydrogène en présence de platine :

$$E\ FAD + H^+ + e \longrightarrow E.FADH$$

Cette semiquinone résiste à toute tentative de réduction par le glucose ce qui élimine la possibilité d'existence d'un tel intermédiaire lors de la mise en place du processus d'oxydation du glucose par la flavine enzymatique.

Admettant donc ce processus à 2 électrons et sachant par ailleurs que tous les potentiels normaux apparents à pH 7 des systèmes flaviniques biologiques déterminés jusqu'alors sont compris entre - 60 mV et - 220 mV, il semble probable que le potentiel normal apparent à pH 7 de la glucose oxydase soit compris dans cette fourchette.

La constante d'équilibre de la réaction globale

glucose + E FAD $\rightleftharpoons$ gluconolactone + E $FADH_2$

exprimée en fonction des valeurs des potentiels normaux apparents des 2 couples rédox impliqués par la formule

$$\log K_{app} = \left(E'^{\circ}_{FAD} - E'^{\circ}_{glu} \right) \frac{RT}{2,3\ n}$$

sera comprise entre 5.10^4 et 10^{10}, ceci à tout pH puisque le bilan de protons de la réaction est nul.

Cette réaction s'accompagnera d'une variation d'énergie libre négative, elle est donc thermodynamiquement possible, d'autant plus facile que $E'_{o\ E.FAD}$ est plus élevé.

Comme de plus la gluconolactone formée s'hydrolyse spontanément en acide gluconique $CH_2OH\text{-}(CHOH)_4CO_2H$, la réaction sera déplacée dans le sens de la formation des produits par effet de concentration.

Dans les conditions réactionnelles habituelles, l'enzyme et son cofacteur sont introduits dans le milieu en quantité catalytique très faible. Pour que la réaction puisse s'étendre à la totalité du glucose présent, il faut donc que le coenzyme soit constamment régénéré sous forme oxydée. L'agent oxydant intervenant en milieu aérobie est l'oxygène de l'air suivant :

$$FADH_2 + O_2 \rightleftharpoons FAD + H_2O_2$$

réaction catalysée par la glucose oxydase elle-même et déplacée vers la droite par élimination de l'eau oxygénée formée qui subit une oxydo-réduction interne

$$H_2O_2 \rightleftharpoons H_2O + 1/2\ O_2$$

cette dernière réaction est catalysée enzymatiquement par la catalase, autre enzyme qui accompagne la glucose oxydase et dont l'élimination nécessite une séparation soigneuse.

On voit donc que les facteurs qui interviennent dans l'ensemble de la réaction sont assez nombreux et que les moyens d'action tendant à modifier son déroulement habituel seront de ce fait assez divers.

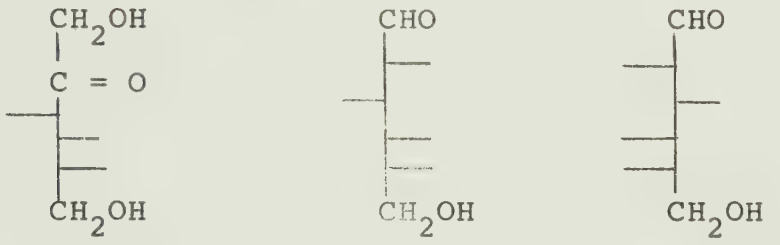
Il est pour le moment impossible de voir si le substrat se fixe sur la partie protéique de l'enzyme en absence de flavine puisque ces 2 molécules sont liées par covalence et que les traitements ayant pour but de détruire leur liaison s'accompagnent toujours d'une dénaturation plus ou moins grande de la protéine. Il sera par contre possible d'opérer sous pression partielle d'oxygène nulle et d'étudier ce qui se passe en absence de catalase (soit à l'aide de glucose oxydase parfai-

tement purifiée ne renfermant plus de catalase soit en inhibant la catalase par des ions CN^- ou Ag^+ par exemple).

Pour nos différents essais, nous avons utilisé des préparations commerciales d'enzyme en suspension dans une solution de $(NH_4)_2SO_4$ (provenance Sigma) ou d'enzyme lyophilisée (provenance Boehringer).

Les sucres que nous avons mis en contact avec membranes et mousses sont :

- le βD glucose (I)
- le D fructose (II) choisi pour sa configuration assez voisine de celle du D glucose ; tous les C asymétriques du D fructose se retrouvent en effet avec la même configuration dans le D glucose qui possède en outre un 4ème C asymétrique ;
- le L glucose (III), énantiomère du D glucose



(II) (I) (III)

Les différentes expériences effectuées soit avec l'un des sucres en solution pure soit avec des mélanges D glucose - D fructose ou D glucose - L glucose nous ont permis de mettre en évidence la non réactivité du D fructose et du L glucose que l'on retrouve en totalité dans la solution éluée. Par contre le D glucose se fixe sur l'enzyme vraisemblablement jusqu'à saturation des sites enzymatiques présents. Le complexe obtenu est particulièrement stable, ce qui est favorable à sa formation donc à l'obtention de solutions de L glucose ou D fructose pratiquement pur à partir d'un mélange avec le D glucose. Il nous a par contre été impossible d'effectuer la réaction inverse :

$$ES \longrightarrow E + S$$

donc de récupérer le substrat D glucose, même en faisant varier le pH ou en rétablissant la pression d'oxygène non nulle en présence d'un inhibiteur ; nous n'avons pu libérer les sites enzymatiques qu'en poursuivant la réaction normalement, c'est-à-dire en oxydant le D glucose.

Ce résultat vient d'ailleurs confirmer expérimentalement les suggestions de Laser qui, expliquant l'action de P_{O_2} sur le K_M conclut que l'hypothèse simplificatrice de Michaelis-Menten ($k_2 >> k_3$) n'est pas applicable à la glucose oxydase. De même, Slater calculant k_1, k_2 et k_3 à partir des cinétiques de réaction à différentes valeurs de P_{O_2}, obtient les résultats suivants :

$$k_1 = 4{,}2.10^4 \text{ mole.litre}^{-1} \quad k_2 \simeq 0 \quad k_3 = 175 \text{ sec}^{-1}$$

Nous nous trouvons donc ici en présence d'une réaction enzymatique à k_1 particulièrement important, ce qui explique que le complexe enzyme-Dglucose se forme très facilement ; cet avantage est malheureusement contrebalancé par deux inconvénients : k_2 étant presque nul, il paraît à priori impossible de renverser la cinétique de formation du complexe en modifiant les conditions expérimentales. De plus, k_3 étant grand, la réaction ES $\longrightarrow$ E + P sera rapide et il sera difficile de bloquer la réaction au stade de la formation de ES.

L'exemple choisi représente donc un cas limite particulièrement favorable par sa grande sélectivité mais qui n'est pas entièrement satisfaisant du point de vue opérationnel puisque, par suite de la très grande stabilité du complexe formé, il n'est pas possible de récupérer le D glucose non dégradé. Il présente toutefois, comparé à la méthode en solution, l'avantage de fournir directement et rapidement une solution presque pure en sucre non complexé par l'enzyme. En effet, en solution, la réaction enzymatique conduit à l'obtention d'un mélange d'ose non attaqué enzymatiquement et d'acide gluconique ; on se trouve donc en présence d'un mélange de deux composés chimiques différents dont la séparation sera plus facile que celle des oses de la solution initiale mais constituera tout de même une étape expérimentale supplémentaire.

Grâce à l'insolubilisation de l'enzyme, il suffira de passer du milieu anaérobie (barbotage de N_2) au milieu aérobie pour obtenir <u>successivement</u> :

- une solution de sucre n'ayant pas formé de complexe avec l'enzyme
- une solution d'acide gluconique provenant de la dégradation aérobie du complexe enzyme substrat.

De plus les sites enzymatiques sont alors libérés et prêts à intervenir dans la formation d'un complexe avec un nouvel apport de D glucose.

La méthode peut être intéressante pour éliminer le D glucose de tout mélange de sucres. D'autre part, elle peut apporter un moyen de détermination expérimentale des ordres de grandeur de k_1 et k_2 : une fixation importante et instantanée du substrat correspond à un k_1 grand devant k_2 et la difficulté de destruction du complexe donne une mesure de l'ordre de grandeur de k_2.

Nous disposions, pour l'expérimentation de 2 types de support solide

- une membrane protéique de 2.10^{-3}cm d'épaisseur et renfermant 0,15mg soit 2 unités de glucose oxydase (SIGMA) par cm^2. Cette membrane a été préparée suivant la technique perfectionnée par D. Thomas ;
- une mousse préparée au sein de l'équipe à partir d'albumine liophylisée après addition de glucose oxydase, cette mousse très divisée permet, après broyage, d'obtenir des colonnes homogènes dans lesquelles il est possible de faire passer une solution avec un débit suffisant (de l'ordre de 10 à 15 $cm^3\ h^{-1}$ pour une colonne de $1cm^2$ de section). Cette mousse contient environ 15 UI de glucose oxydase par gramme.

II.1.2. - <u>Expériences sur membranes</u>.

Lorsqu'une membrane enzymatique telle que celle dont nous disposons ici va séparer deux compartiments d'une cellule renfermant l'un une solution d'un ou plusieurs solutés l'autre le solvant pur, chacun des solutés va diffuser à travers la membrane ; le processus intervenant dépendra à la fois du soluté et des conditions de milieu et appartiendra nécessairement à l'un des 3 types suivants :

- diffusion simple
- diffusion absorption
- diffusion réaction

- Le premier comportement diffusion simple- sera celui de tout soluté traversant la membrane sans qu'aucune interaction membrane soluté ait lieu : dans l'exemple choisi ici, tout ose autre que le D glucose traversera donc la membrane en diffusion simple. Nous n'analyserons pas ici ce comportement tout à fait classique .

- Si le soluté est susceptible de former un complexe avec la membrane il y aura alors : diffusion absorption . Tel sera le cas du D glucose pénétrant sous des conditions anaérobies dans une membrane contenant de la glucose oxydase. Ce comportement, dont les détails n'ont jamais été étudiés, et qui débouchera sur la rétention dans la membrane du composé considéré et donc sur son isolement, est celui qui nous interesse particulièrement dans ce travail.

- Si le soluté est transformé chimiquement lorsqu'il pénètre dans la membrane, il s'agit d'une diffusion réaction, comportement qui a été étudié par THOMAS et.al sur divers exemples dont celui considéré ici.

L'ensemble des équations décrivant le phénomène et permettant en particulier d'établir les profils de concentration du substrat dans la membrane a été décrit par THOMAS et par SELEGNY.

Nous vérifierons donc dans un premier temps que la membrane dont nous disposons ici permet de retrouver, lors d'expériences de diffusion réaction de D glucose, des résultats concordant avec ceux obtenus par THOMAS et nous calculerons à l'aide des équations mentionnées ci-dessus le profil de concentration du substrat dans la membrane, profil dont nous suivrons l'évolution au cours du temps.

Nous passerons ensuite au cas de la diffusion-absorption du glucose à travers la membrane et essaierons enfin d'appliquer les résultats obtenus au mélange de deux sucres à séparer tels que D glucose et fructose.

Les expériences sur solution pure de D glucose ont été effectuées dans une cellule de dialyse de surface utile s = 40 cm^2, le volume de chaque compartiment étant de 75 cm^3, la caractéristique de cellule est donc $\frac{V}{s}$ = 1,9cm.

Le compartiment donneur contient une solution initiale de D glucose 10^{-2}M à pH 6,5 et le compartiment accepteur une solution tampon phosphate pH 6,5. On met donc en présence 80 unités de glucose oxydase fixées dans la membrane et 750 µmoles de glucose en solution d'où un rapport $\frac{glu}{UI} \simeq 10$.

Les courbes de variation de la concentration de glucose en fonction du temps dans chaque compartiment sont établies en présence soit d'un barbotage d'oxygène soit d'un barbotage d'azote. Le glucose est dosé enzymatiquement sur de très faibles prélévements (0,1 cm^3) ce qui ne modifie pas sensiblement le volume total des solutions au cours du temps.

II.1.2. 1) Expérience à $P_{O_2} \neq 0$

Nous avons réalisé une première série d'expériences en milieu aérobie. Le bullage d'oxygène maintenu dans chaque compartiment assure l'agitation constante de la solution et une concentration en oxygène de l'ordre de $1,5.10^{-3}$M. Les courbes obtenues dans une telle expérience (fig. II.1) résultent de la combinaison de 2 phénomènes : diffusion simple du glucose à travers la membrane et réaction enzymatique.

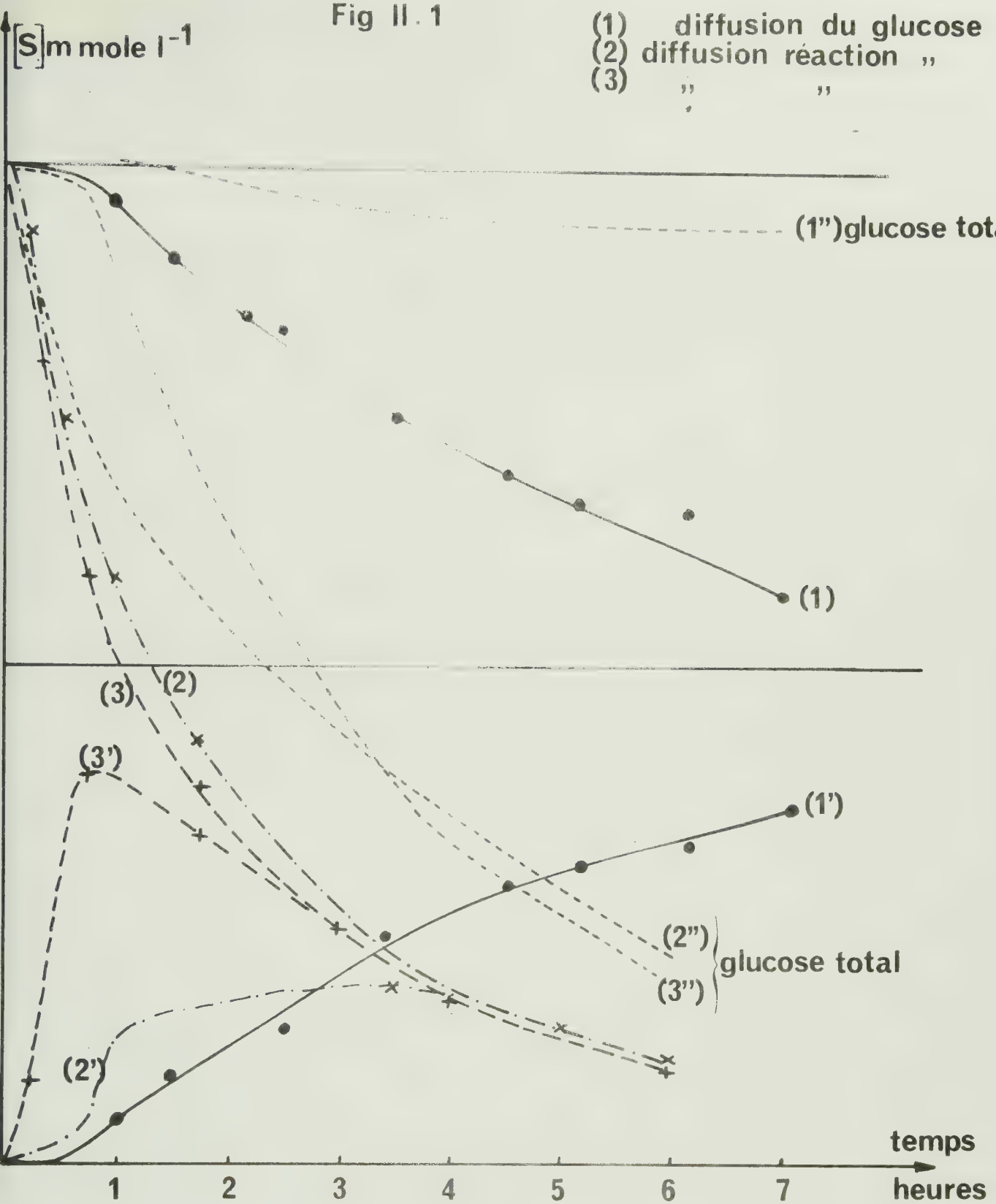
L'analyse qualitative de ces courbes met en évidence que :

- dès les premières minutes les flux entrant et sortant de glucose correspondant à la tangeante à la courbe (Glu) = f(t) à l'instant considéré, sont importants.

- pour un ensemble de conditions donné, les flux entrants varient fort peu d'une expérience à l'autre comme le montrent les courbes 2 et 3, figure (II.1), qui représentent les limites de l'espace temps-concentration à l'intérieur desquelles se trouvent toutes les courbes obtenues lors d'une série d'expériences successives identiques.

- par contre le flux sortant est modifié constamment lorsqu'on passe d'une expérience à la suivante (courbes limites 2' et 3', figure II.1) et ceci jusqu'au moment où les concentrations de glucose deviennent identiques de part et d'autre de la membrane. Cette évolution du flux sortant avec le numéro de l'expérience est caractérisé par une nette augmenta-

Fig II.1



Etude comparée de la diffusion absorption et de la diffusion-réaction d'une solution de D glucose à travers une membrane G.O.

tion du flux instantané initial et une diminution du temps au bout duquel ce flux s'annule avant de changer de sens (maximum de la courbe $S_2 = f(t)$). On note enfin que les flux J_1 et J_2 deviennent d'autant plus vite égaux en valeur absolue que la membrane a plus travaillé.

Il semble donc que le comportement instantané de la membrane face au glucose se modifie avec le nombre de sollicitations des sites enzymatiques sans toutefois qu'il y ait modification globale de l'activité enzymatique puisqu'au bout de quelques heures la quantité de glucose consommé est constante pour un ensemble donné de conditions opératoires. Les courbes 2, qui correspondent à la 1ère expérience réalisée sur une membrane enzymatique fraichement préparée concordent parfaitement avec celles obtenues expérimentalement par Thomas.

Si l'agitation est suffisante pour que les solutions soient homogènes dans chaque compartiment, interface liquide-membrane comprise, les courbes expérimentales de la figure II.1 permettent d'atteindre les valeurs des concentrations en glucose S_1 et S_2 aux deux interfaces ainsi que celles des flux instantanés entrant et sortant pour chaque temps de diffusion-réaction.

A partir de ces données expérimentales, si l'on connaît par ailleurs :

- le coefficient D de diffusion pure du substrat considéré,

- les grandeurs caractéristiques de la réaction enzymatique : constante de Michaelis K_M et vitesse maximum de réaction V_M, et si l'évolution de l'expérience permet d'admettre que l'ensemble est, à l'instant considéré, dans un état quasi-stationnaire, il est possible de calculer la concentration de substrat en chaque point de la membrane. En effet, celle-ci est alors donnée, comme le démontre E. Sélégny par l'équation générale :

$$\frac{d^2s}{dx^2} = \sigma \frac{s}{1 + s} \qquad \text{équ. II.1}$$

dans laquelle les paramètres, sans dimension, ont la signification suivante :

$$s = \frac{S}{K_M} = \frac{\text{concentration de glucose au point X}}{\text{Constante de Michaelis}}$$

$$x = \frac{X}{e} = \frac{\text{abcisse du point considéré dans la membrane}}{\text{épaisseur de la membrane}}$$

et σ est un coefficient relié aux caractéristiques de la membrane par :

$$\sigma = \frac{e^2}{D} \quad \frac{V_M}{K_M}$$

Si, comme dans le cas présent, les concentrations aux interfaces membrane solution sont du même ordre de grandeur que K_M, l'ordre de la réaction varie entre 0 et 1 et l'équation II.1 ne présente pas de solution analytique : il est toutefois possible de calculer la valeur approximative de S (x) en chaque point de la membrane en effectuant, à partir de cette équation, un développement en série de Mac Laurin qui, limité aux termes en x^4 conduit aux résultats suivants :

- près de x = 0

$$s(x) = s_1 - \frac{x}{1!}\,\sigma\,\frac{J_1}{Ve} + \frac{x^2}{2!}\,\sigma\,\frac{S_1}{1+s_1} - \frac{x^3}{3!}\,\sigma^2\,\frac{1}{(1+s_1)^2}\,\frac{J_1}{Ve} + \frac{x^4}{4!}\,\sigma^2\,\frac{s_1}{(1+s_1)^3} - 2\,\frac{x^4}{4!}\,\sigma^3\,\frac{1}{(1+s_1)^3}\left(\frac{J_1}{Ve}\right)^2 \qquad \text{équ. II.2}$$

- près de x = 1

$$s(x) = s_2 - \frac{x-1}{1!}\,\sigma\,\frac{J_2}{Ve} + \frac{(x-1)^2}{2!}\,\sigma\frac{s_2}{1+s_2} - \frac{(x-1)^3}{3!}\,\sigma^2\frac{1}{(1+s_2)Ve}\,\frac{J_2}{Ve} + \frac{(x-1)^4}{4!}\,\sigma^2\,\frac{s_2}{(1+s_2)^3} - \frac{2\,(x-1)^4}{4!}\,\sigma^3\,\frac{1}{(1+s_2)^3}\left(\frac{J_2}{Ve}\right)^2 \qquad \text{équ. II.3}$$

Lors de nos expériences, la variation des concentrations S_1 et S_2 au cours des premières heures est beaucoup trop rapide pour qu'on puisse admettre que les conditions d'un état quasistationnaire sont satisfaites. Les équations ci-dessus ne sont donc pas applicables en toute rigueur avant des temps de 3 heures de diffusion-réaction au moins ; nous les avons toutefois appliquées dès 1 heure de diffusion-réaction en supposant que le profil de concentration du glucose à l'intérieur de

la membrane obtenue, s'il n'était pas alors exact, donnerait une idée approximative de la réalité et permettrait de mieux voir l'évolution des concentrations de glucose à l'intérieur de la membrane au cours du temps.

Les profils de concentration ont été établis dans les deux cas correspondant aux courbes 2 et 3 figure II.1.

Les valeurs de S_1 et S_2 utilisées pour ces déterminations sont données expérimentalement par les courbes 2 et 3 figure II.1. Les coefficients sans dimension $\frac{J_1}{Ve}$ et $\frac{J_2}{Ve}$ ont été dans chaque cas calculés à l'aide des équations (II_2) et (II_3) d'où l'on peut déduire (E. Sélégny) :

$$\frac{J_1}{Ve} = \frac{s_1 - s_2}{\sigma} \quad \frac{(1+s_1)^2}{(1+s_1)^2 + \frac{\sigma}{6}} + \frac{s_1}{4!} \quad \frac{12\,(1+s_1)^2 + \sigma}{(1+s_1)\left[(1+s_2)^2 + \frac{\sigma}{6}\right]} \qquad \text{(équ.II.4)}$$

$$\frac{J_2}{Ve} = \frac{s_1 - s_2}{\sigma} \quad \frac{(1+s_2)^2}{(1+s_2)^2 + \frac{\sigma}{6}} + \frac{s_2}{4!} \quad \frac{12\,(1+s_2)^2 + \sigma}{(1+s_2)\left[(1+s_2)^2 + \frac{\sigma}{6}\right]} \qquad \text{(équ.II.5)}$$

ce qui nous a paru préférable à une évaluation expérimentale directe de J_1 et J_2, possible à partir des courbes de la figure II.1 mais peu précise. Les valeurs ainsi calculées sont rassemblées dans le tableau II.1. Le coefficient $\bar{D}$ a été déterminé expérimentalement dans le cas d'une diffusion pure (tableau II.2) et les paramètres K_M et V_M ont été établis à partir d'un diagramme de Lineweaver et Burk construit pour la membrane étudiée.

Leurs valeurs sont respectivement :

$K_M = 3\ \mu\ M.\ cm^{-3}$

$V_M = 37{,}7\ \mu\ M.\ min^{-1}/cm^3$ de membrane

La valeur de K_M a été étudiée en appliquant en différents points des courbes 2 et 3 figure II.1, la formule :

$$\frac{1}{2}\ \frac{J_1^2 - J_2^2}{\bar{D}} = k_2\ E_o\ (S_1 - S_2 + K_M \log \frac{S_2 + K_M}{S_1 + K_M}) \qquad \text{(équ. II.6)}$$

	temps	$\frac{S_1}{K_M}$	$\frac{S_2}{K_M}$	$\frac{J_1}{Ve}$ calc.	$\frac{J_2}{Ve}$ calc.
Courbe 2 Figure II.1	1h.	1,96	0,41	0,52	0,03
	2h.	1,30	0,54	0,35	-0,07
	3h.	0,85	0,59	0,23	-0,13
	4h.	0,59	0,57	0,16	-0,15
	5h.	0,48	0,48	$0,13_5$	$-0,13_5$
	6h.	0,35	0,35	$0,10_5$	$-0,10_5$
Courbe 3 Figure II.1	1h.	1,69	1,30	0,34	-0,21
	2h.	1,13	1,06	0,25	-0,22
	3h.	0,78	0,78	0,19	-0,19
	4h.	0,54	0,54	0,15	-0,15
	5h.	0,44	0,44	0,13	-0,13
	6h.	0,33	0,33	0,10	-0,10

Tableau II.1

Il faut remarquer que, pour l'expérience correspondant à la courbe 2 figure II.1 il existe quelques contradictions importantes entre les valeurs des flux sortant calculées et celles déductibles de l'expérience. L'examen de cette courbe montre en effet que les flux sortants restent positifs au cours des trois premières heures de diffusion réaction alors que le calcul donne une valeur de $\frac{J_2}{Ve}$ donc de J_2 négative dès deux heures de diffusion réaction et déjà presque nulle au bout d'une heure. Cette contradiction disparait lorsqu'on applique le même genre de calcul à l'expérience correspondant à la courbe 3 figure II.1. Il apparait donc que l'ensemble des résultats obtenus à partir d'une membrane ayant été soumise à plusieurs diffusion-réactions successives et dont chaque site réactionnel a été sollicité plusieurs fois est plus cohérent.

De plus la réactivité initiale de la membrane est nettement améliorée (pénétration instantanée du glucose dans la membrane accélérée et augmentation corrélative de la vitesse initiale de réaction enzymatique).

L'ensemble des profils de concentration donné sur la figure II.3, paraît donc être représentatif du comportement habituel de la membrane après qu'elle ait été équilibrée par plusieurs cycles réactionnels. Il est en tous cas, surtout au cours des premières heures plus proche de la réalité que l'ensemble des profils présentés sur la figure II.2, où le type même du profil pour des temps de diffusion réaction de 2 et 3 heures n'est pas conforme à la réalité expérimentale.

Lorsque le profil de concentration du substrat dans la membrane présente un minimum, la position de ce dernier dépend de la valeur de $j = \frac{J_1}{J_2}$:

Si $j = -1$, le profil est symétrique par rapport à l'axe d'abscisse $x/2$.

Si $o > j > -1$, la position du minimum peut être calculée à partir de l'équation (III 2) dont la dérivée par rapport à x doit s'annuler lorsque $s_{(x)} = s_{min.}$. L'expression de cette dérivée, limitée aux termes en x^2 est :

$$-\frac{ds(x)}{dx} = \sigma \frac{J_1}{Ve} - \sigma \frac{S_1}{1+S_1} x + \frac{\sigma^2}{2} \frac{1}{(1+S_1)^2} \frac{J_1}{Ve} x^2$$

Profils de concentration de substrat à l'intérieur d'une membrane G.O neuve, en milieu aérobie

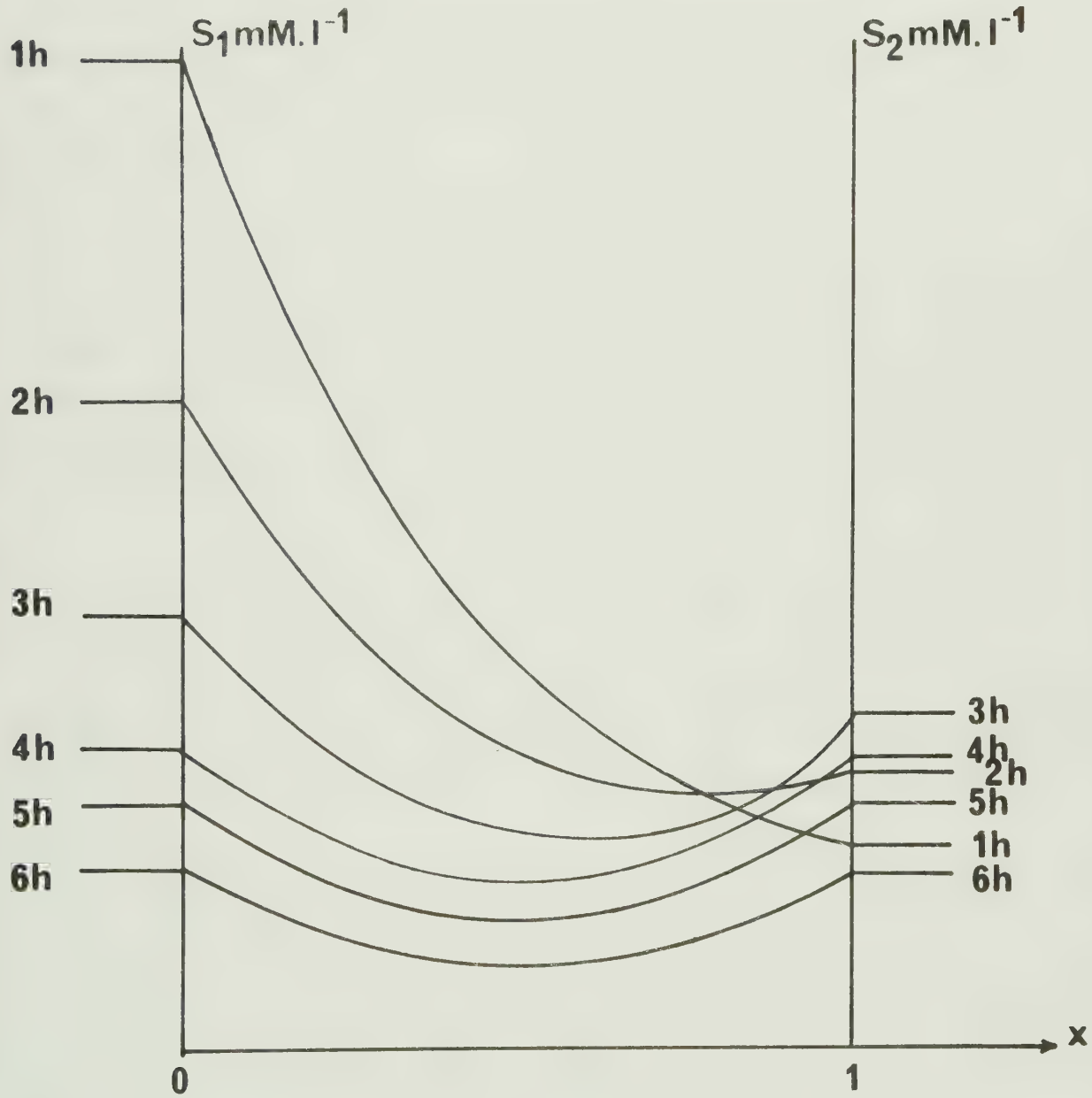


Fig II.2

elle s'annule pour une valeur $x_{min.}$ de la variable x correspondant à

$$x_{min.} = \frac{s_1 \pm \sqrt{s_1^2 - 2\sigma\left(\frac{J_1}{Ve}\right)^2}}{\frac{\sigma}{1+s_1}\quad\frac{J_1}{Ve}}$$

Les profils de concentration présentés sur le graphique (II 3) ont été tracés en tenant compte de la valeur obtenue pour ce minimum .

Rappelons que lorsque $j > o$ le profil de concentration ne présente pas de minimum.

II.1.2. 2). Expérience à $po_2 \neq 0$

Dans une expérience de ce type, les variations de concentrations de glucose dans les deux compartiments doivent être dues à la diffusion absorption. Les courbes obtenues présentent effectivement un profil tout à fait différent du cas précédent. On remarque en particulier que les flux instantanés aussi bien entrants que sortants sont beaucoup plus faibles que précédemment, surtout en début d'expérience.

Comme le montre l'allure des courbes II.1 la diffusion est pratiquement nulle au cours des premières minutes ($\Delta S = f(t) \sim 0$ dans chaque compartiment). Si de plus on détermine à partir de la figure II.1 les valeurs des flux instantanés entrants et sortants au bout d'un certain temps, on remarque que le flux instantané sortant reste constamment inférieur au flux instantané entrant (tableau II.2) pendant les premières heures

Temps	ΔS $\mu M.cm^{-3}$	J_{ie} $\mu M.cm^{-2}.h^{-1}$	J_{is} $\mu M.cm^{-2}h^{-1}$	$\bar{D}$ cm^2h^{-1}
1h	9,2	1,98	$1,87_5$	$0,43.10^{-3}$
2h	7,2	1,66	1,31	$0,46.10^{-3}$
3h	5,9	1,35	1,03	$0,46.10^{-3}$
4h	4,7	0,94	0,93	$0,40.10^{-3}$
7h	2,2	0,73	0,62	$0,66.10^{-3}$

Tableau II.2

$\bar{D}$: perméabilité (coefficient de diffusion apparente)

Profils de concentration de substrat dans une membrane GO équilibrée par plusieurs cycles réactionnels

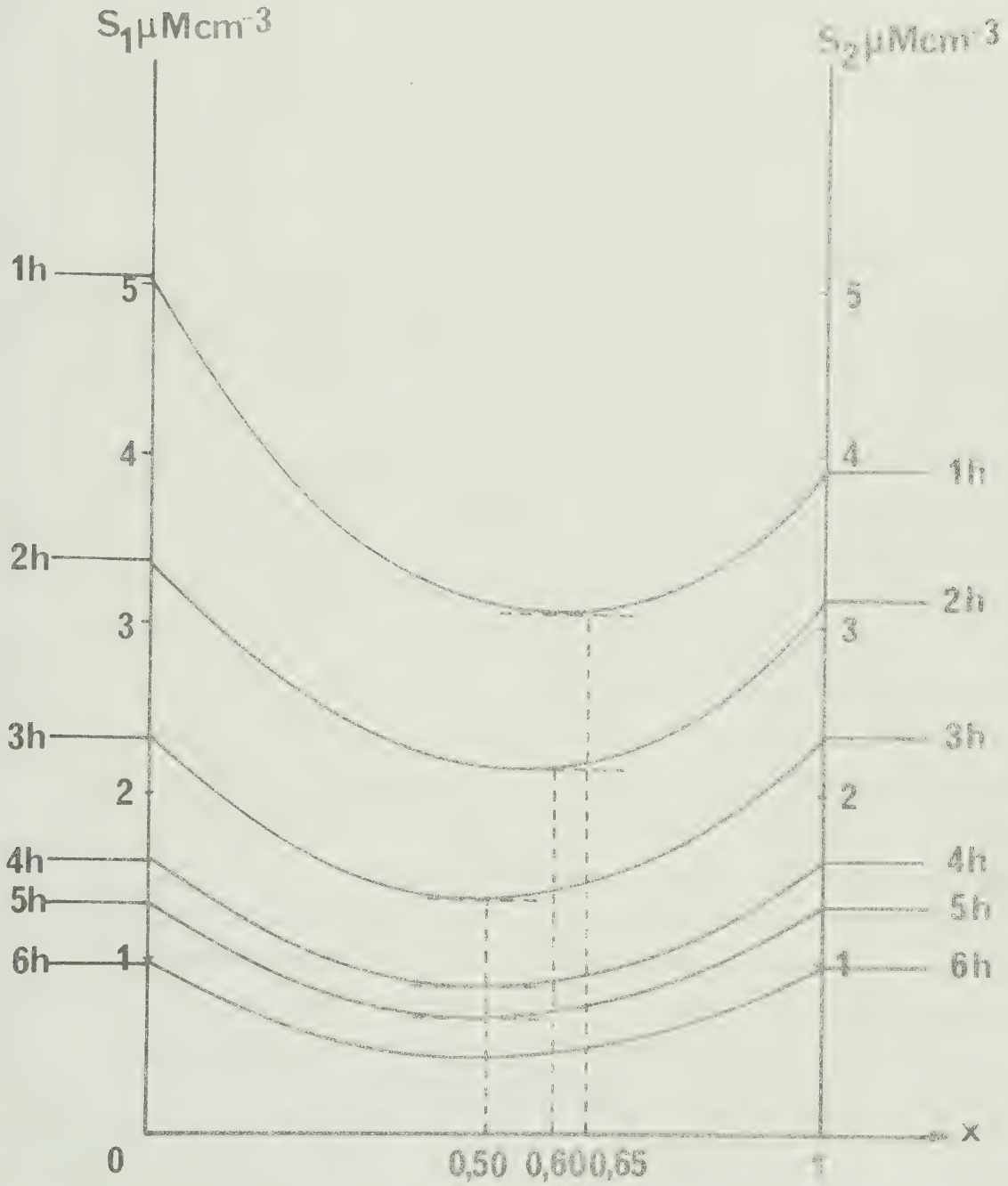


Fig II.3

Ceci se traduit par un déficit total en glucose de 40 µmoles en 6 heures soit un peu plus de 5% de la quantité initiale.

Ces résultats conduisent à admettre qu'une partie du glucose pénétrant dans la membrane s'est fixée sur les sites enzymatiques pour former un complexe enzyme-substrat suivant la réaction :

$$E.FAD + Glu \rightleftarrows E.FAD\text{-}Glu$$

et que, ou bien ce complexe est stable et reste dans la membrane ou bien la réaction se poursuit jusqu'à l'obtention de gluconolactone :

$$E.FAD - Glu \rightarrow E.FADH_2 + \text{gluconolactone}$$

dans la limite d'un turnover puisque l'absence d'oxygène dans le milieu élimine toute possibilité de réoxydation de l'enzyme, étape indispensable à la mise en place d'un nouveau turnover.

Il n'est pas possible, à ce stade de trancher entre les 2 hypothèses car même si la réaction s'est poursuivie après obtention du complexe et a finalement conduit à la formation d'acide gluconique, ce dernier sera à faible concentration, -3.10^{-4}M d'acide total,- ce qui n'entrainera aucune variation de pH du milieu réactionnel fortement tamponné.

De plus, il n'a pas été possible de vérifier par spectrophotométrie si l'enzyme était sous forme oxydée (bande d'absorption à 450nm) car la membrane est fortement colorée et absorbe totalement dans cette région du spectre.

Notons enfin que notre membrane renferme 80 UI de glucose oxydase qui dans les conditions opératoires maximales transforment 80 µmoles de glucose en acide gluconique par minute ; si tous les sites flaviniques ont été touchés par le glucose dans la présente expérience, cela signifierait qu'il y a 40 µmoles d'enzyme décomptées en FAD dans la membrane, donc que dans les conditions optimales chaque Flavine subit 2 turnovers par minute.

Ces deux types d'expériences nous ont permis de nous assurer d'une part que l'enzyme fixée dans la membrane gardait son activité, ce qui est vérifié par la diffusion réaction, d'autre part qu'un barbotage d'azote suffisait à stopper la transformation du glucose, tout au moins en grande partie (94%).

Dans la dernière colonne du tableau (II.2) nous avons donné une estimation du coefficient apparent de diffusion simple du glucose à travers la membrane, calculé en appliquant la loi de Fick :

$$\overline{D} = \frac{Je}{\Delta S}$$

(J étant le flux entrant de glucose, e l'épaisseur de la membrane et ΔS la différence des concentrations en glucose dans les deux compartiments).

On aboutit ainsi à une valeur moyenne : $\overline{D} = 4{,}5.10^{-4}$ cm^2 h^{-1} au cours des quatre premières heures, ce qui correspond à une diffusion assez lente du glucose à travers la membrane. Il s'agit d'ailleurs en fait d'un coefficient de perméabilité qui encore ne tient pas compte de l'inégalité des flux entrant et sortant.

La variation totale de la concentration en substrat avec le temps est donnée en chaque point de la membrane par l'équation :

$$\frac{dS}{dt} = \frac{\delta S}{\delta t}_{\text{diffusion}} + \frac{\delta S}{\delta t}_{\text{Absorption}} \qquad \text{(équ. II.7)}$$

dont le 1er terme est, d'après la seconde loi de Fick :

$$\frac{\delta S}{\delta t}_{\text{diffusion}} = \overline{D}_S \frac{d^2 S_X}{dX^2}$$

$\overline{D}_S$ étant le coefficient de diffusion apparent explicité ci-dessus et X l'épaisseur de la membrane.

Le second terme de l'équation (II.7) peut être explicité à partir de la réaction de formation du complexe

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \qquad K = \frac{k_1}{k_{-1}}$$

par la relation $\frac{\delta S}{\delta t}_{\text{Absorpt.}} = k_1 S_X$

si l'on connait k_1 et F_o, concentration totale de l'enzyme, ce qui n'est pas le cas dans l'expérience considérée ici.

II - 1.2. 3). Diffusion comparée du D glucose et du D fructose à travers une même membrane à $p_{O_2} \neq 0$ (atmosphère saturée en N_2).

La comparaison des flux de molécules semblables mais dont l'une seulement est susceptible de se fixer peut mieux permettre d'interpréter les résultats expérimentaux. On peut en effet prévoir à priori que l'un des sucres - le D fructose - sera soumis à une diffusion simple, le D glucose étant,lui, soumis à une diffusion absorption.

A cet effet, nous avons préparé en parallèle 2 membranes protéiques d'épaisseur identique ($e = 4.10^{-3}$ cm) mais dont une seule contenait de la glucose oxydase. Il était en effet indispensable de pouvoir comparer les comportements de nos molécules de glucose et fructose lors de la diffusion à travers la membrane G.O et à travers une membrane aussi voisine que possible de celle-ci mais inerte biochimiquement.

Par ailleurs, nous avons changé les caractéristiques de cellule - surface utile, beaucoup plus faible, ($4 cm^2$) et volume de chaque compartiment 50 cm^3 - afin de ralentir la diffusion et de mieux contrôler le phénomène. La membrane G.O étant un peu plus chargée que la précédente ($2,5$ UI cm^{-2}), il y aura donc 10 UI/4 cm^2 de glucose oxydase, soit au total une quantité beaucoup plus faible que précédemment se trouvant placée sur le trajet de 500 µ moles de D glucose (ou D fructose) - 50 cm^3 de solution 10^{-2}M - d'où un rapport $\frac{Glu_{init.}}{UI} = 50$.

Nous avons suivi la variation de la concentration d'ose dans chaque compartiment de la cellule en fonction du temps dans les cas suivants :

- solution pure de glucose
- solution pure de fructose
- mélange glucose-fructose

Ces solutions étant mises en présence de chacune des 2 membranes préparées : membrane vide et membrane chargée en glucose oxydase.

Des courbes expérimentales ainsi obtenues (fig II.4) on peut déduire, dans chaque cas, la variation des flux entrant et sortant de chaque ose (fig II.5 et II.6) ainsi que les rapports des flux de chacun des 2 oses

DIFFUSION D'OSE 10^{-2} M A TRAVERS UNE MEMBRANE CHARGEE OU NON A LA GLUCOSE OXYDASE

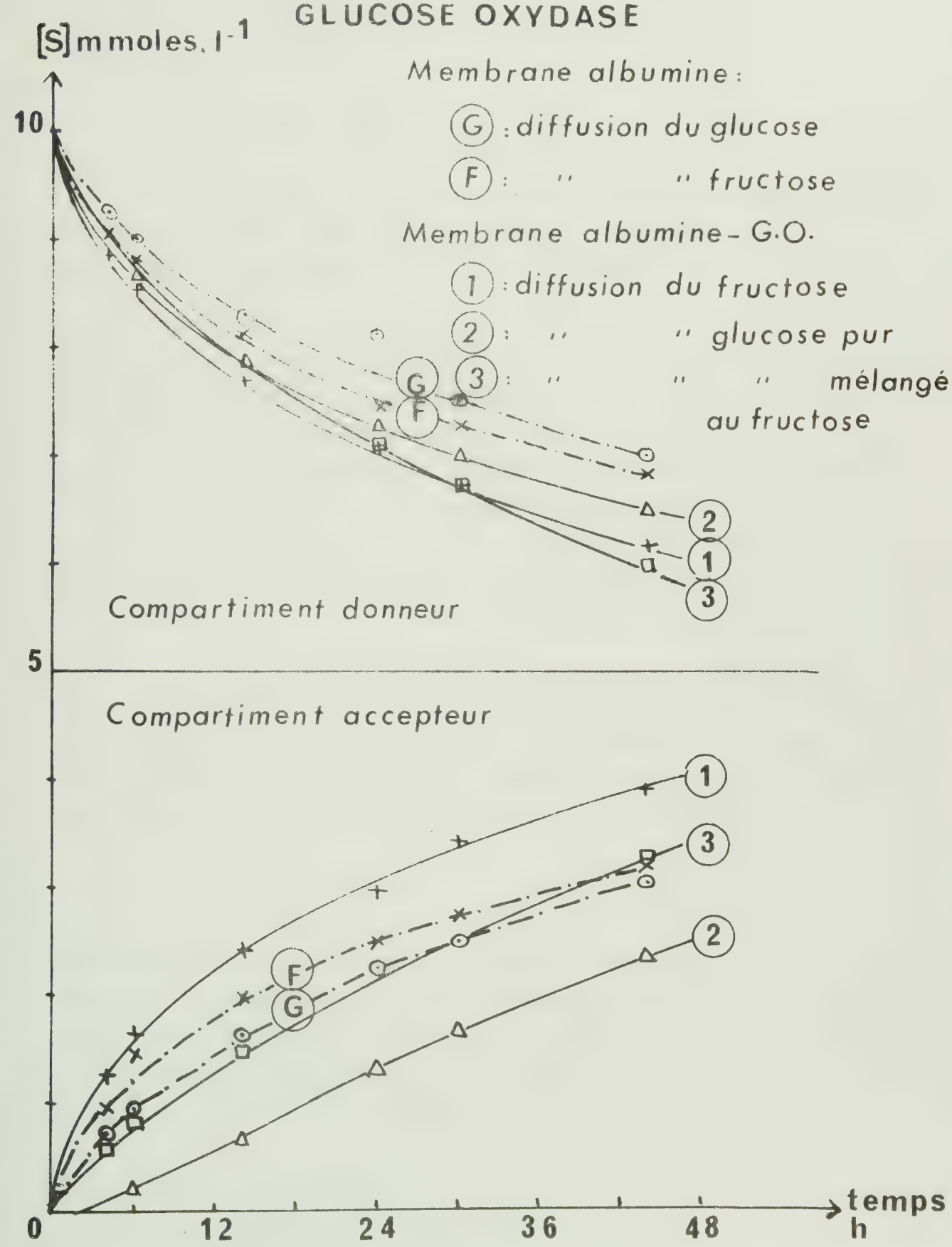


Fig. II.4

en présence de la même membrane et dans des conditions expérimentales identiques (tableau II.3).

L'examen de ces courbes et tableau permet d'aboutir aux conclusions suivantes :

1°) Le D fructose, qui ne se fixe pas sur l'enzyme diffuse de manière pratiquement identique à travers les 2 membranes et qu'il soit seul ou mélangé au D glucose. La petite différence enregistrée entre les courbes de variation de flux à travers l'une ou l'autre membrane (courbes 1 et 2 fig II.5) est vraisemblablement due à un indice de réticulation légèrement différent pour les 2 membranes . De plus, les flux entrants et sortants sont toujours identiques (dans les limites de la précision de l'expérience) ce qui confirme bien que le D fructose est soumis à une diffusion simple même en présence d'une membrane chargée en glucose oxydase. On peut donc dire que, si les caractéristiques de membrane restent par ailleurs inchangées, l'addition de glucose oxydase ne modifiera en rien le comportement du D fructose face à la membrane. Ce comportement n'est en outre pas influencé par l'addition dans la solution d'un 2ème ose.

2°) D fructose et D glucose traversent la membrane vide en diffusion simple et dans des conditions très voisines comme le montrent les rapports de flux (entrants ou sortants) des 2 sucres toujours assez voisins de 1 (tableau II.3) et la comparaison des coefficients apparents de diffusion calculés en divers points des courbes S = f (t) (tableau II.4):

$$\frac{D_F - D_G}{D_F} = 0,1$$

Remarquons que ces coefficients apparents évoluent au cours du temps car les conditions expérimentales sont fort éloignées de celles d'un état stationnaire surtout en début d'expérience ; ils tendent vers une limite égale au coefficient de diffusion vrai, atteint lorsque les conditions de milieu correspondent à un état quasi stationnaire.

Temps de réaction	6h	12h	18h	24h	48h
Membrane vide					
Flux entrant	0,87	1	1,17	1,10	1,19
Flux sortant	1,4	1,06	1,26	1,10	1
Membrane G.O					
1 Glucose pur					
Flux entrant	1	1,01	0,86	0,76	0,84
Flux sortant	0,31	0,58	0,79	0,92	1,40
2 Melange glucose-fructose					
Flux entrant	1,10	1,24	1,06	1,07	1,40
Flux sortant	0,71	0,71	0,85	0,92	1,27

Valeurs des rapports de flux $\frac{J_G}{J_F}$ (flux relatifs de D glucose)

Tableau II.3

Temps de réaction	6h	12h	18h	24h	48h
D Glucose	0,69	0,56	0,51	0,44	0,36
D Fructose	0,79	0,61	0,45	0,44	0,4

Coefficients de diffusion apparents D (μ moles.h^{-1}.cm^2).10^3

de Glucose et Fructose à travers une membrane albumine

Tableau II.4

ÉVOLUTION DES FLUX INSTANTANÉS DE FRUCTOSE

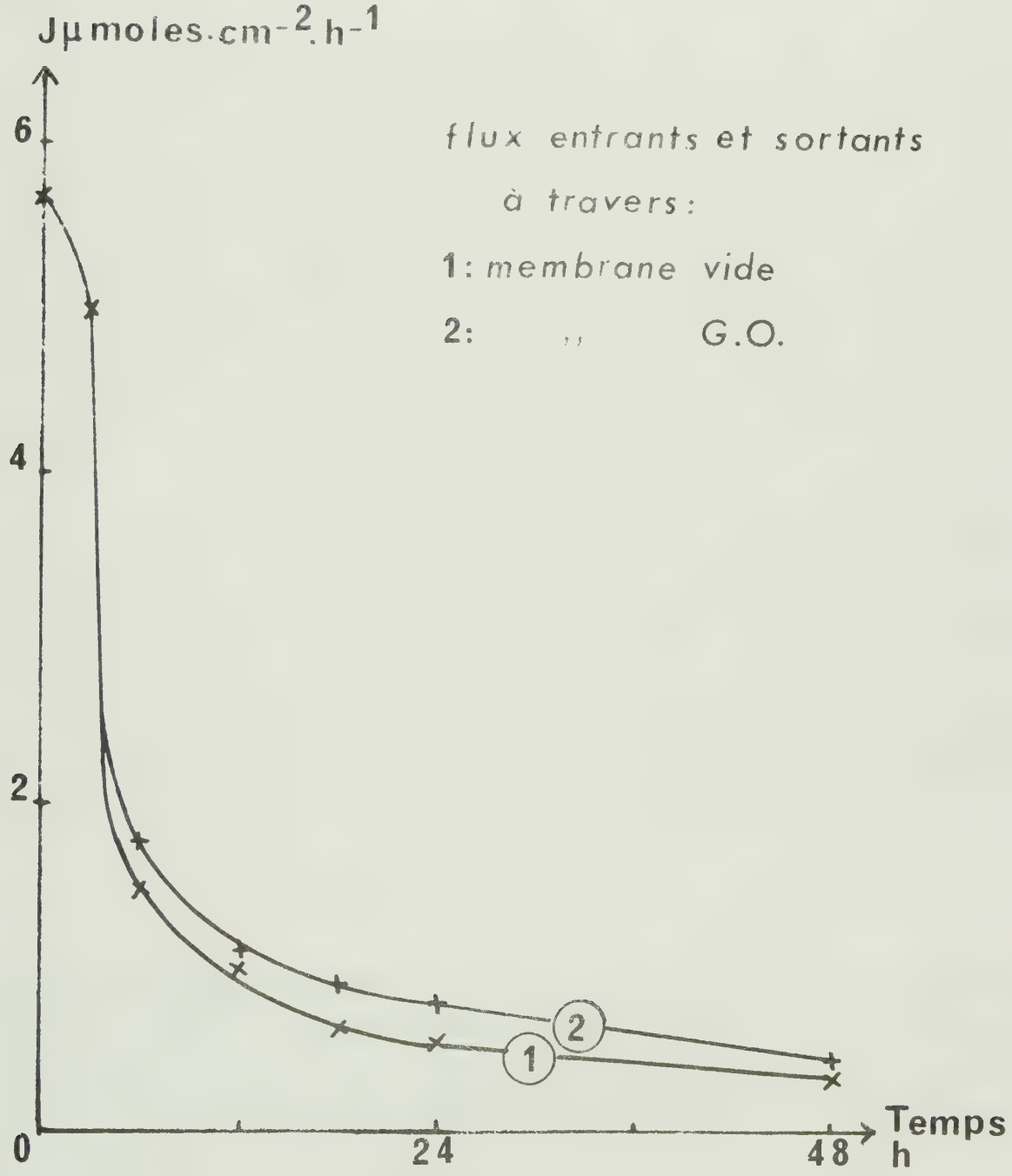


Fig. II. 5

3°) Le comportement du D glucose en présence d'une membrane chargée en glucose oxydase se différencie très nettement aussi bien du comportement du D fructose dans les mêmes conditions que du comportement du D glucose face à une membrane vide décrit au paragraphe précédent. Les modifications les plus importantes interviennent au niveau des flux sortants et sont de plus différentes suivant que le D glucose est en solution pure (courbes J'_1 et J'_2 fig II.6) ou en mélange avec le D fructose (courbes J''_1 et J''_2 fig II.6).

L'examen des rapports de flux $\frac{J_G}{J_F}$ rassemblés dans le tableauII.3 montre que, au cours des premières heures de l'expérience, le flux sortant de glucose est très nettement ralenti par rapport à celui du fructose alors que les flux entrants restent du même ordre de grandeur. Une partie des molécules de glucose reste donc bloquée dans la membrane ; ce phénomène est plus marqué si le D glucose est pur que s'il est en mélange avec le D fructose. Il semble que, par suite d'un phénomène de couplage dont le mécanisme reste à préciser, le D fructose masque partiellement les sites enzymatiques au D glucose ; ceci risque à priori de diminuer le taux de séparation des 2 sucres.

Dans le cas d'une solution pure de D glucose on remarque que les flux sortants (courbe J'_2 fig II.6) augmentent jusqu'à un maximum puis diminuent très lentement, beaucoup plus lentement que les flux entrants auquels ils deviennent supérieurs. Il y a donc alors plus de molécules de glucose sortant de la membrane que de molécules y pénétrant, cet excédent ne pouvant provenir que d'une relaxation d'une partie du glucose accumulé dans la membrane au cours des premières heures qui peut s'expliquer par un déplacement dans le sens -1 de l'équilibre

$$S + E \underset{-1}{\overset{1}{\rightleftharpoons}} ES$$

dû à une diminution au cours du temps de la concentration en glucose dans la membrane. Ce phénomène est plus nettement mis en évidence si l'on examine la variation de la quantité totale de D glucose présente à chaque instant dans la cellule en fonction du temps de contact membrane solution (fig II.7, courbe 3).

ÉVOLUTION DES FLUX INSTANTANÉS DE GLUCOSE

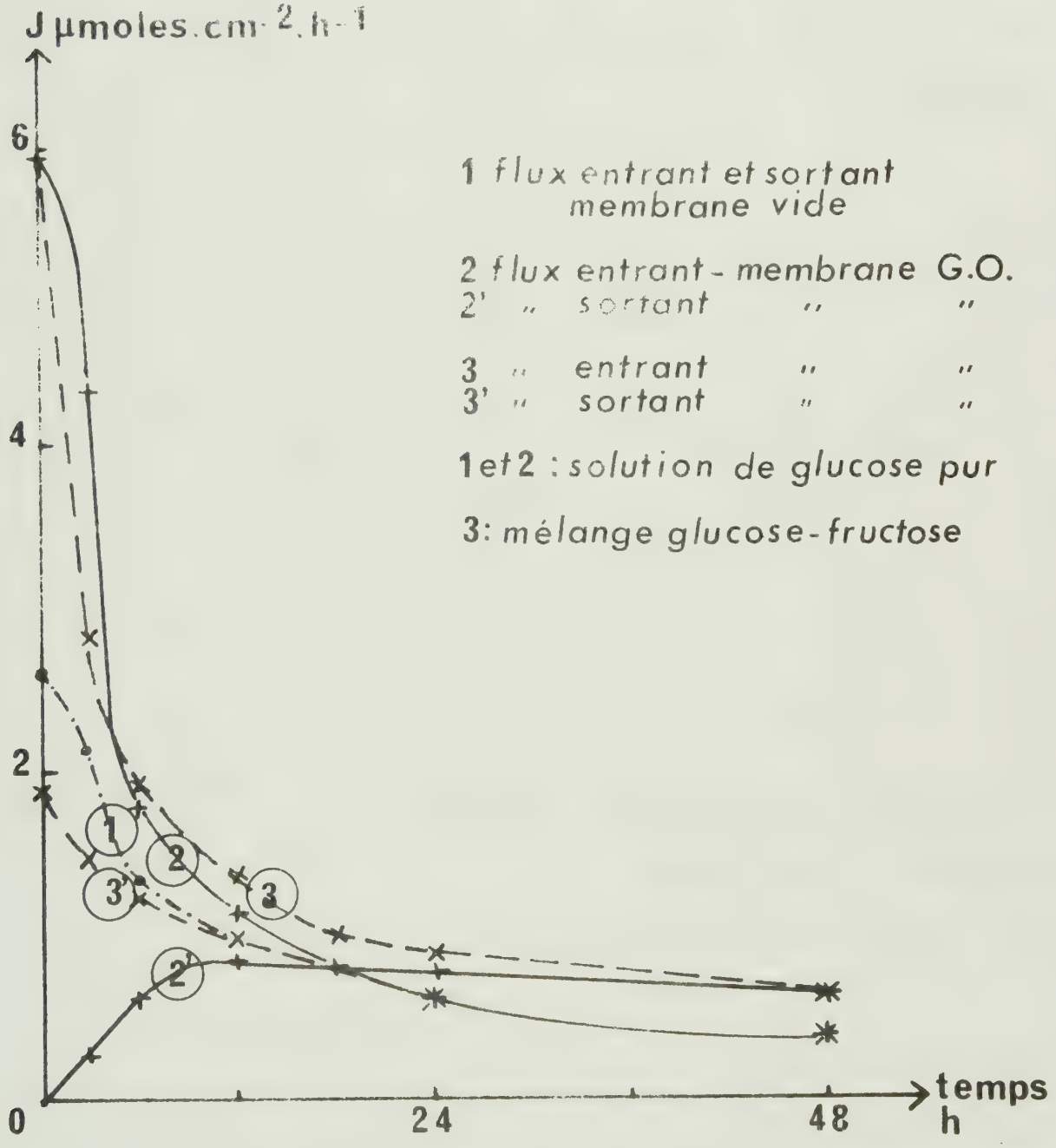


Fig.II.6

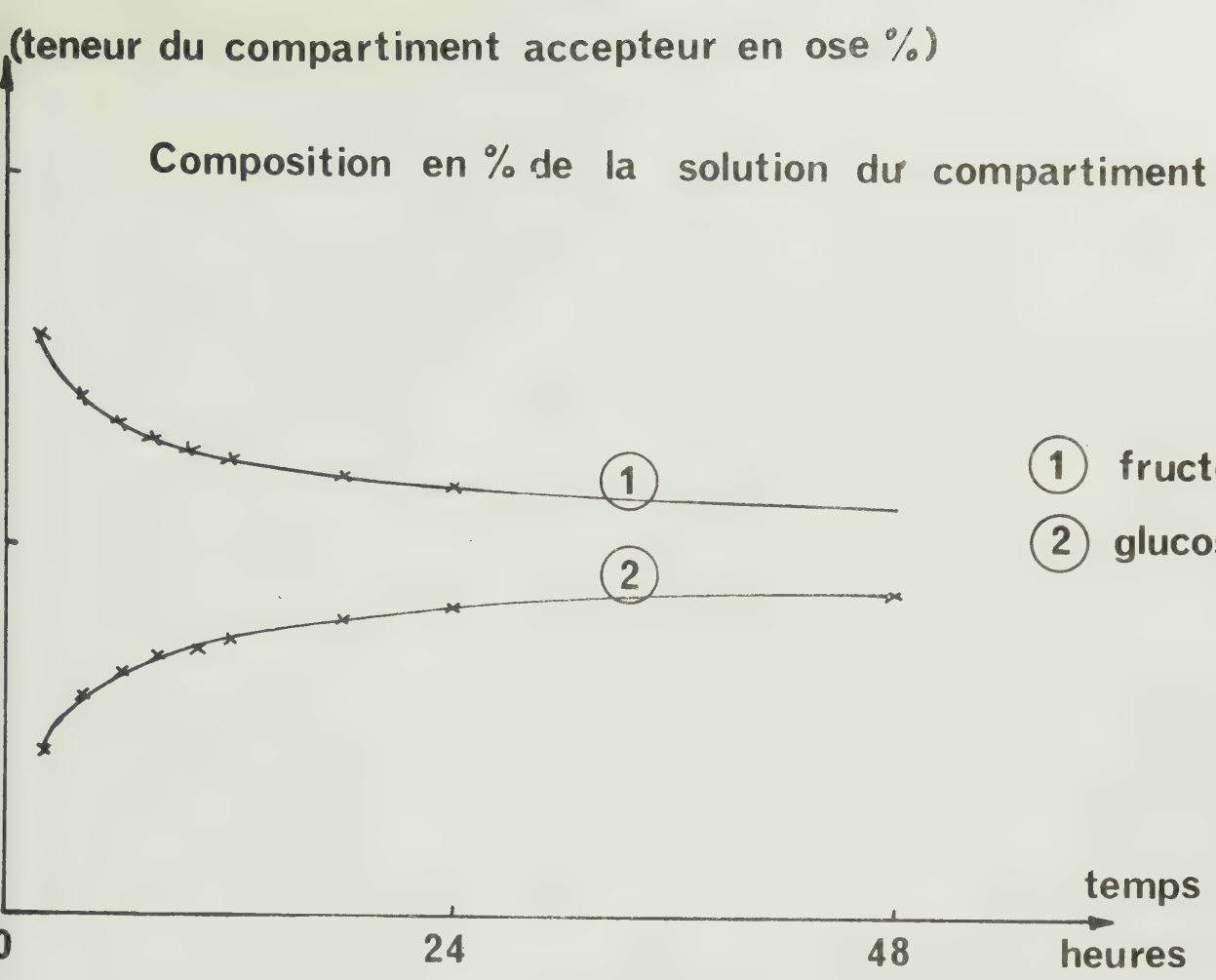


Fig II.8

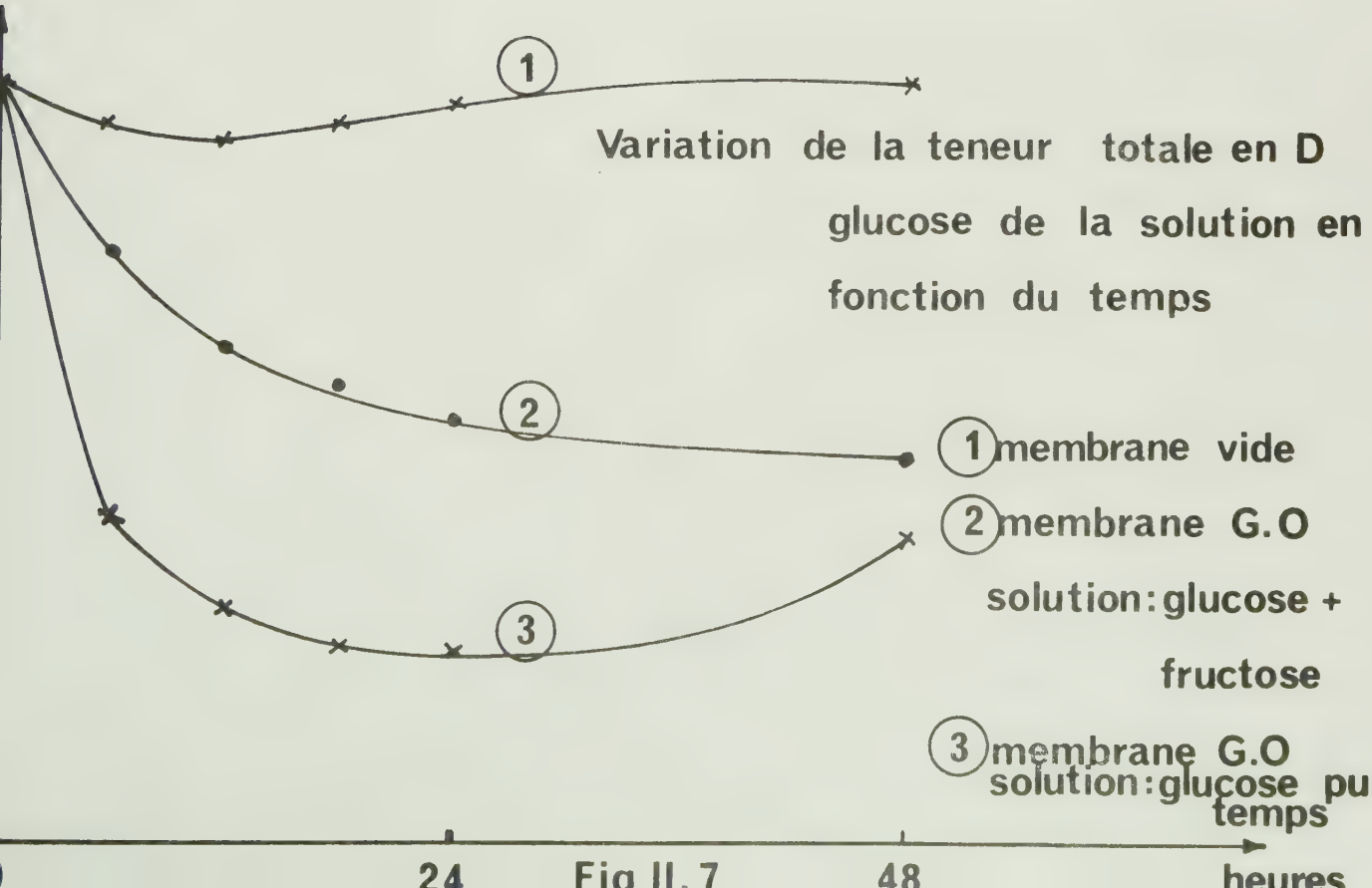


Fig II.7

Lorsque la solution contient un mélange D glucose - D fructose, l'absorption de D glucose dans la membrane est beaucoup plus progressive que ci-dessus mais tend vers une même limite, qui est de l'ordre de 50 µmoles de D glucose adsorbé pour 10 UI de glucose-oxydase soit 5 µmoles de D glucose adsorbé / UI d'enzyme. Ceci conduirait donc à admettre que chaque unité d'enzyme correspond au minimum à 5 sites enzymatiques, ce qui est nettement supérieur au résultat obtenu au paragraphe II.1.2.2. dans un cas correspondant au même type d'expérience mais avec des caractéristiques de membrane différentes.

La membrane est alors séparée de la solution de sucre et mise en présence de tampon phosphate en milieu aérobie, conditions qui permettent à la réaction enzymatique de se poursuivre

$$ES \longrightarrow E + P$$

Après 24 h de réaction on vérifie que la solution contient bien 50 µmoles d'acide supplémentaires par un dosage acidimétrique. Ces 50 µmoles d'acide correspondent à la formation d'acide gluconique à partir du glucose absorbé. On retrouve bien expérimentalement le résultat attendu théoriquement à $\pm$ 5% près suivant les essais.

II - 1.2. 4) Rendement de la séparation D glucose - autre ose.

Du point de vue de la séparation des oses qui nous préoccupe essentiellement dans ce travail, on voit que, malgré la faible quantité de glucose oxydase mise en jeu dans l'expérience ci-dessus, il est possible d'obtenir dans le compartiment accepteur une solution enrichie en D fructose. La composition de la solution évolue conformément au diagramme présenté sur la fig (II.8). Il ne sera pas possible en une seule étape de récupérer dans le compartiment accepteur une solution pure de D fructose puisque, dès les 1ères minutes, des traces de D glucose y apparaissent (courbe 3, fig. II.4.). La fig (II-8) montre que l'enrichissement maximum en D fructose sera obtenu en début d'expérience mais au détriment de la concentration : au bout de 2h, la solution est $1,15.10^{-3}$M en ose total et contient 78% de D fructose ; au bout de 4h la solution est $1,65.10^{-3}$M en ose total mais ne contient que 70% de D fructose ; après 24h

d'expérience la solution est $5,05.10^{-3}$M en ose total mais ne contient plus que 58% de D fructose.

On voit donc qu'il n'y aura aucun intérêt à poursuivre la dialyse au delà de 2 à 4h, si l'on veut obtenir un rendement convenable en pureté du sucre à isoler. Il serait certainement possible d'améliorer le résultat obtenu en imaginant une cellule à plusieurs compartiments séparés les uns des autres par des membranes enzymatiques, le premier contenant au départ le mélange D glucose - autre hexose et les suivants du tampon. La dialyse à travers chaque membrane s'accompagnera d'une absorption de D glucose donc d'une purification du D fructose restant mais entrainera une grande dilution de la solution initiale. C'est pourquoi, les expériences sur membrane ayant bien mis en évidence la différence de comportement entre le D glucose et le D fructose, nous avons poursuivi les essais de séparations sur une colonne de mousse renfermant de la glucose oxydase, technique qui permettra de mettre en présence d'une solution donnée une quantité beaucoup plus importante d'enzyme insolubilisée et devrait donc conduire à des résultats plus directement exploitables du point de vue de la séparation.

II.1.3. Essais de séparation sur mousse G.O. en milieu anaérobie.

Ces expériences ont été réalisées simultanément sur 2 colonnes de mousse de protéine (albumine) de caractéristiques identiques, l'une contenant, greffée dans la mousse, de la catalase associée à la glucose oxydase, l'autre ne contenant que la glucose oxydase. Les résultats trouvés sont reproductibles d'une colonne à l'autre ce qui prouve que le seul barbotage d'azote est suffisant pour bloquer la réaction enzymatique, au moins dans sa seconde partie.

En effet la catalase ne peut intervenir que si de l'eau oxygénée est formée dans le milieu lors de la réoxydation du coenzyme par des traces d'O_2. Les colonnes renferment 10g de mousse soit environ 150 U.I. théoriques d'enzyme correspondant à 120 unités expérimentales. Le débit de la colonne est réglé à 12 $ml.h^{-1}$.

II.1.3 1) Fixation élution d'un mélange D glucose - L glucose ou D fructose.

Dans une 1ère série d'expériences nous avons tenté de séparer, d'une part un mélange D glucose - D fructose, d'autre part un mélange D glucose - L glucose en introduisant dans la colonne 250 µmoles de chaque sucre (en solution 5.10^{-3}M dans un tampon phosphate) et en éluant au tampon phosphate pH 6,5 ; l'éluat est récupéré par fractions de 5ml. Le diagramme d'élution correspondant est représenté sur la fig. (II.9).

Il met en évidence :

1) que la mousse se comporte bien comme la membrane : en effet L glucose ou D fructose sont récupérés en totalité après passage de la solution sur la mousse (tableau II.5 expériences (1) et (2) ; la totalité de l'ose concerné se retrouve expérimentalement à $\pm$ 3% près, ce qui représente une excellente précision compte tenu du fait que ce L glucose (ou D fructose) total est obtenu par addition des quantités dosées dans chaque fraction éluée.

2) Qu'une partie du D glucose n'est pas récupérée à l'élution : on élue seulement 140 µmoles dans chacune des 2 expériences soit 56% du D glucose introduit. Cette proportion est la même quel que soit l'ose accompagnateur : D fructose ou L glucose ; on peut donc en conclure que le comportement du D glucose en présence de la glucose oxydase insolubilisée n'est pas influencée par la nature de l'autre hexose présent dans la solution.

3) que la quantité de D glucose non récupérée correspond à 110 µmoles/150 UI de G.O. soit moins de 1 µmole/UI proportion nettement inférieure à celle obtenue lors des expériences de membrane précédentes. On est donc amené à conclure à une accessibilité aux sites enzymatiques moins bonne dans le cas de la mousse que dans celui de la membrane mais il faut remarquer que la solution utilisée est 2 fois plus diluée dans le cas de l'expérience sur mousse.

Le D glucose non récupéré peut à priori

- soit être fixé sur la mousse,
- soit être passé en solution après transformation en acide D gluconique. Dans ce dernier cas, on devrait

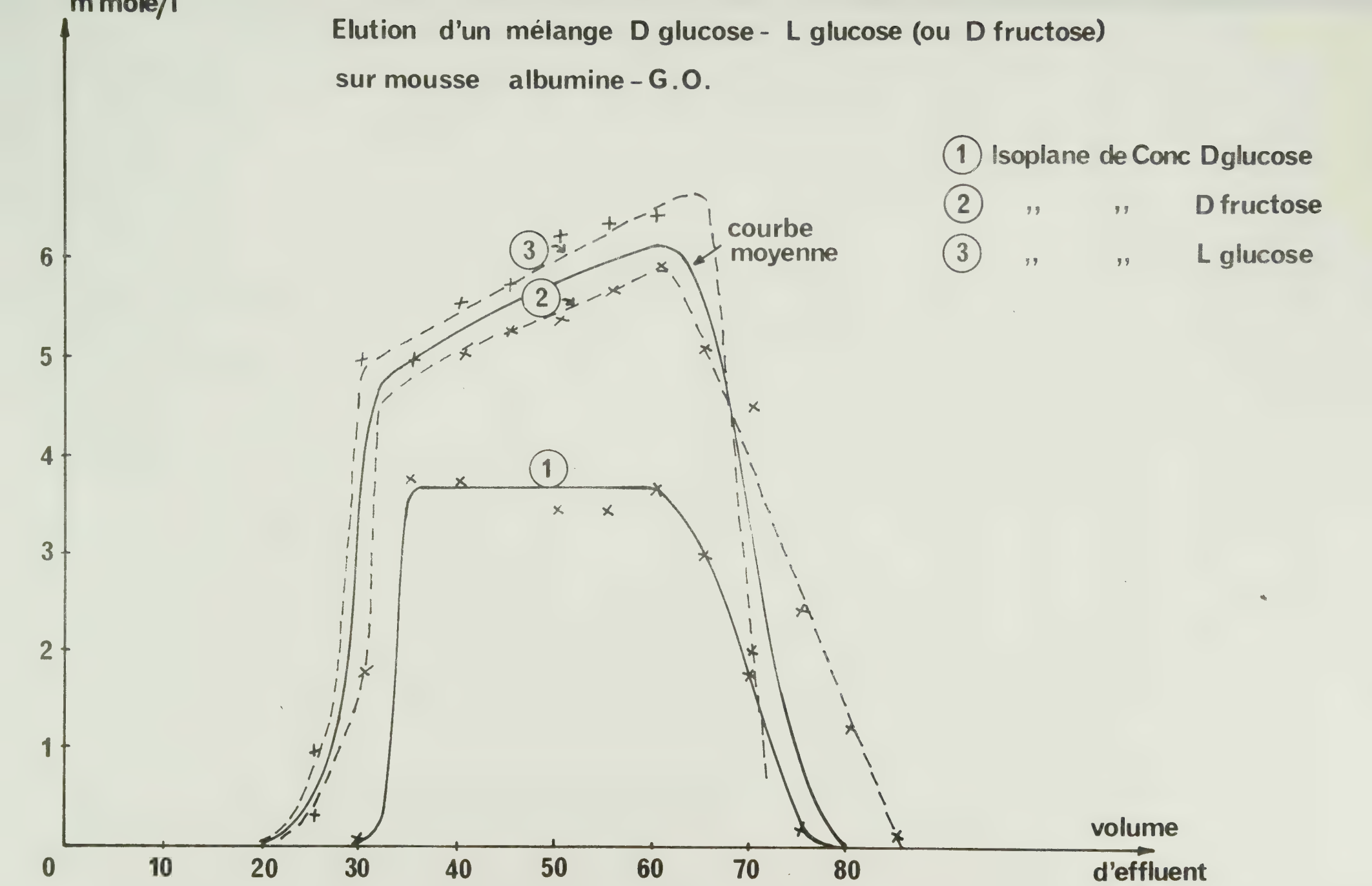

m mole/l
Elution d'un mélange D glucose - L glucose (ou D fructose)
sur mousse albumine - G.O.
1 Isoplane de Conc Dglucose
2 ,, ,, D fructose
3 ,, ,, L glucose
courbe moyenne
6
5
4
3
2
1
0
10
20
30
40
50
60
70
80
volume d'effluent

Fig II. 9

récupérer 110 µmoles d'acide D gluconique sur les 60ml d'éluat ce qui correspondrait à une concentration moyenne de l'ordre de 2 $mM.l^{-1}$, or un dosage protométrique ne fait apparaître aucune variation d'acidité par rapport au tampon phosphate éluant.

On peut donc penser que le D glucose non élué est fixé sur la mousse sous forme d'un complexe avec l'enzyme.

II.1.3. 2) Destruction du complexe enzyme-substrat.

Nous avons tout d'abord tenté de récupérer le D glucose fixé en agissant sur les conditions opératoires dans le but de faire évoluer la réaction

$$E + S \rightleftharpoons ES$$

dans le sens de la dissociation du complexe. Deux techniques nous ont à priori paru susceptibles de conduire au résultat escompté mais ont en fait l'une et l'autre abouti à un échec total.

a) Modification du pH : Thomas ayant établi que la glucose oxydase insolubilisée dans une phase albumine perdait toute activité lorsque le pH du milieu n'était pas compris entre 5 et 8, nous avons pensé que cette perte d'activité pouvait être due à la non complexation du D glucose sur l'enzyme en dehors de cette zone de pH. Tout en conservant des conditions anaérobies nous avons donc effectué plusieurs tentatives de dissociation du complexe à pH 3 (tampon citrate / phosphate) 4,5 (tampon acétate), 8 (tampon phosphate), 10 (tampon glycine / phosphate). Les titrages acidimétrique et polarimétrique nous ont conduit dans tous les cas à conclure à l'absence de D glucose et d'acide gluconique dans l'éluat.

b) Elution à pH 6, en milieu aérobie mais en présence d'un inhibiteur de la glucose oxydase : l'azide de sodium.

Nous avons alors tenté de rétablir les conditions normales de la réaction enzymatique : barbotage de O_2 dans la solution tampon pH 6 mais en présence d'azide de sodium $10^{-3}M$ connu pour ses propriétés inhibitrices de la glucose oxydase. Là encore, nous n'avons trouvé dans l'éluat ni acide gluconique (ce qui confirme bien les propriétés d'inhibiteur de l'azide de sodium) ni D glucose.

Il apparaît donc à peu près impossible de dissocier le complexe D glucose enzyme formé, ce que la valeur élevée de la constante de complexation pouvait laisser prévoir.

c) Continuation de la réaction enzymatique.

Afin de nous assurer que le D glucose était bien fixé sur la mousse et de régénérer la colonne, nous avons alors fait passer sur la mousse 50ml de tampon pH 6 saturé en oxygène et avons effectué un titrage protométrique qui nous a permis de conclure à une augmentation d'acidité de $2 \pm 0,05$ mM l^{-1} pour les deux expériences soit à la présence en solution de $100 \pm 2,5$ µmoles d'acide gluconique. On observe donc un léger déficit par rapport à la quantité attendue (110 µmoles). De plus les sites enzymatiques sont alors libérés et la colonne est prête à être réutilisée.

I.3.3. 3) Etude de la quantité de D glucose fixée en fonction de la quantité introduite.

Afin de préciser les conditions de fixation du D glucose sur la mousse nous avons effectué une série d'essais destinée à voir l'influence de la concentration de la solution initiale sur la quantité fixée et s'il était possible, sur mousse, d'atteindre la valeur obtenue à l'aide de membrane pour le rapport $\frac{\text{µmoles D glucose fixé}}{\text{U.I. enzyme.}}$

Cette série d'essais a été réalisée sur une mousse renfermant de la glucose oxydase exempte de catalase afin de minimiser les risques de réaction parasite due à la présence éventuelle de traces d'oxygène.

Le processus expérimental est le suivant : on fait passer sur la colonne de mousse G.O. successivement 50ml de solution contenant un mélange de D et L glucoses en quantités équimoléculaires mais variables d'une expérience à l'autre, puis du tampon phosphate jusqu'à ce que les fractions récupérées ne contiennent plus d'ose D ou L. Toutes les solutions sont préalablement desoxygénées par barbotage d'azote et la colonne est elle-même maintenue sous azote. Les quantités globales d'oses ainsi récupérées sont données dans le tableau (II.5) et le détail de la répartition des oses dans chaque fraction est représenté sur la fig. (II.10) pour quelques unes des expériences. Cet ensemble d'essais fait apparaître :

Quantité d'ose / nature de l'ose	Totale m M.l^{-1}	Totale µmoles/exp.	Eluée µmoles / exp.
(1)			
D glucose	5	250	140
L fructose	5	250	252
(2)			
D glucose	5	250	140
L glucose	5	250	244
(3)			
D glucose	5	250	160
L glucose	5	250	255
(4)			
D glucose	8	400	120
L glucose	8	400	395
(5)			
D glucose	4	200	115
L glucose	4	200	206
(6)			
D glucose	2,8	140	35
L glucose	2,8	140	159
(7)			
D glucose	2	100	85
L glucose	2	100	104
(8)			
D glucose	1	50	5
L glucose	1	50	52

TABLEAU II.5.

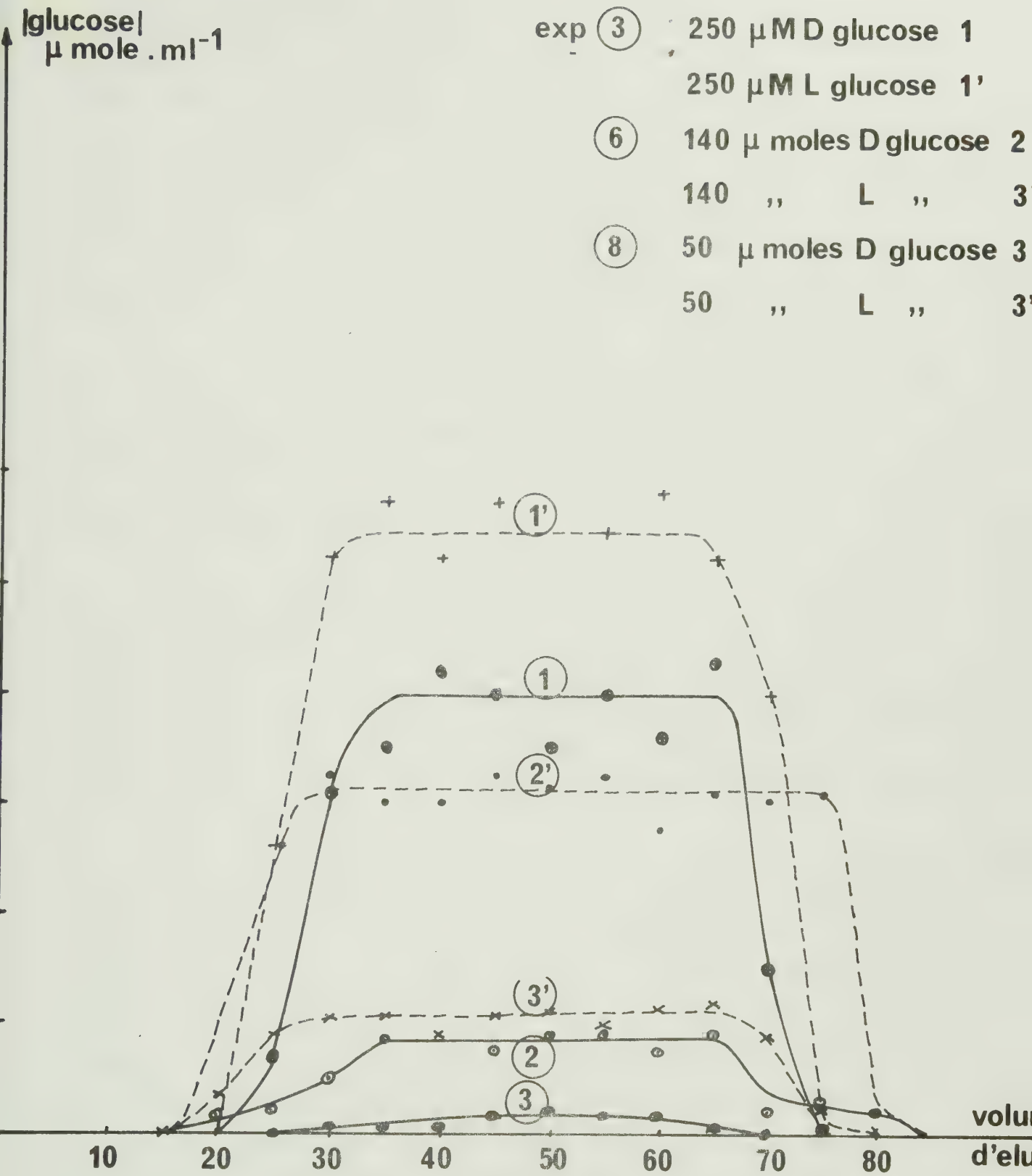


Diagramme d'élution d'un mélange D glucose-L glucose sur mousse G.O sans catalase pour 3 expériences du tableau II

Fig II. 10

1) que l'utilisation d'un échantillon de glucose oxydase exempt de catalase ne modifie pas sensiblement les résultats obtenus ci-dessus avec une glucose oxydase de pureté inférieure donc beaucoup moins onéreuse (expériences (2) et (3), tableau II.5). La quantité de D glucose éluée était même inférieure précédemment, ce qui peut s'expliquer par une oxydation très partielle du D glucose en acide gluconique liée précisément à la présence de catalase mais ne présente aucune importance du point de vue opérationnel puisqu'il est de toute manière impossible de récupérer ensuite le D glucose non transformé.

2) qu'il ne semble pas possible, dans les conditions de débit choisies, de fixer plus d'une µmole de D glucose par unité expérimentale d'enzyme, résultat qui apparaît clairement sur le graphique (II.11) représentant la variation de la quantité de D glucose fixée sur la mousse en fonction de la quantité de ce même sucre introduite.

3) qu'il n'y a pas intérêt à faire passer sur la mousse une quantité de D glucose correspondant à un rapport $\frac{\text{D glucose µmoles}}{\text{G.O. U exp.}} > 1$; en effet tant que ce rapport reste < 1, la quantité de D glucose fixée sur la mousse est sensiblement proportionnelle à la quantité introduite (partie (a) de la courbe II.11) mais ensuite elle n'augmente plus que faiblement (partie (b) de la courbe II.11).

De plus, le rendement en L glucose de bonne pureté optique augmente avec la dilution du mélange passé sur la mousse. L'examen de la fig. (II.10) met en effet en évidence que, dans le cas de l'expérience (8) ou 50 µmoles de chaque sucre ont été mises en présence de la mousse, toutes les fractions de L glucose récupérées ont une pureté au moins égale à 80% et les 3/4 d'entre elles ont même une pureté optique supérieure à 90%. Si l'on regroupe l'ensemble des fractions on obtient une solution moyenne renfermant 90% de L glucose et à peine plus diluée que la solution initiale (0,8 mM au lieu de 1 mM).

Par contre, si l'on considère les résultats de l'expérience (6) qui correspond à un rapport $\frac{\text{glucose introduit}}{\text{U exp. d'enzyme}} = 1{,}1$, la pureté moyenne n'est plus que de 80% pour une solution 2 mM au lieu de 2,8 mM initialement en L glucose et pratiquement aucune fraction n'atteint une pureté optique égale à 90%.

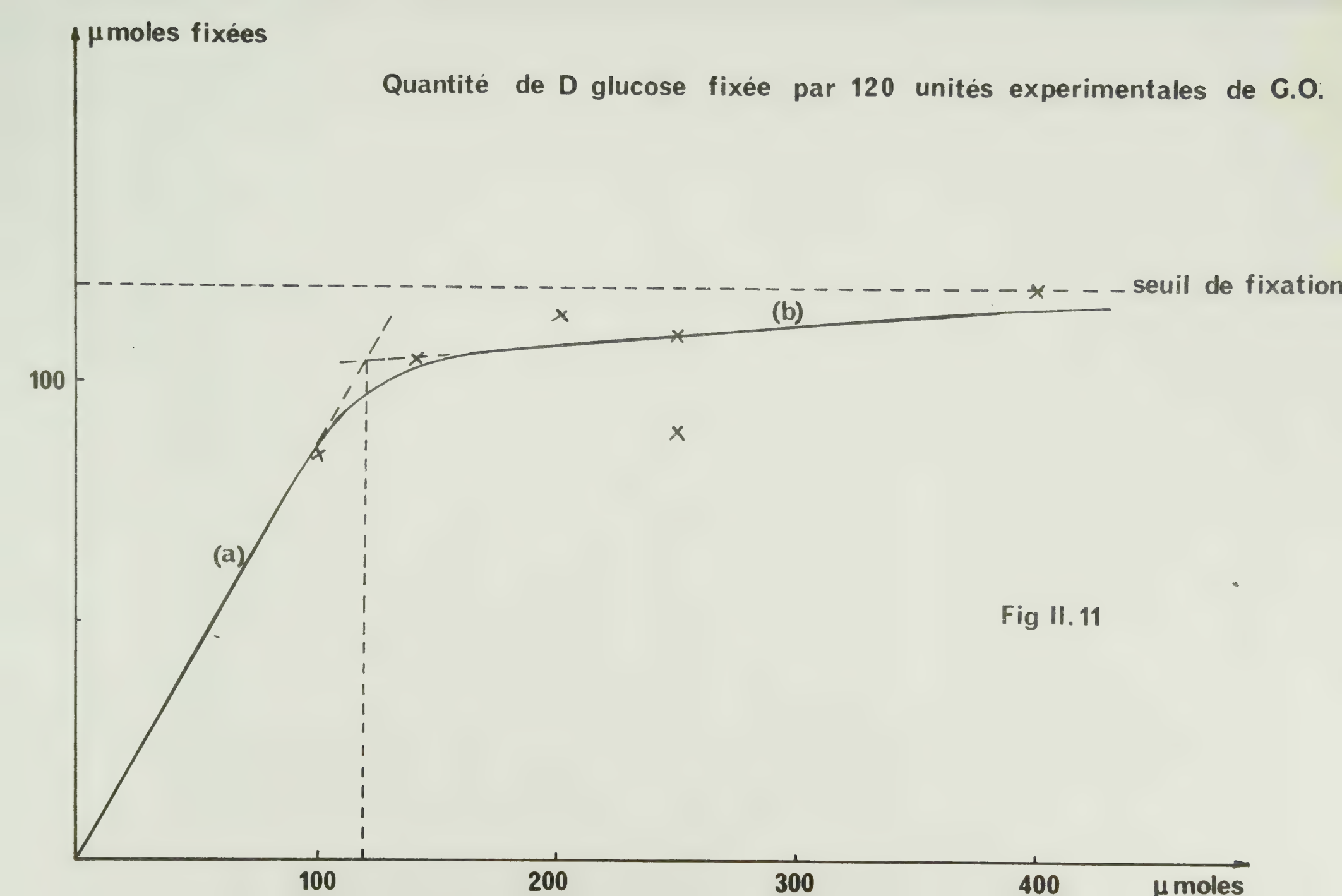

µmoles fixées
Quantité de D glucose fixée par 120 unités experimentales de G.O.
seuil de fixation
100
(a)
(b)
100
200
300
400
µmoles

Fig II.11

II.1.3. 4) Cinétique de disparition du D glucose en milieu anaérobie.

Les essais sur membrane ayant permis dans certains cas de fixer 5 µmoles de D glucose / unité d'enzyme, alors que les expériences sur mousse présentées au paragraphe précédent ne permettent pas de fixer plus d'une µmole de D glucose par unité d'enzyme, nous avons entrepris une série d'essais cinétiques en ampoules destinés à voir si le seuil ainsi atteint était dû seulement aux conditions expérimentales d'écoulement ou était l'image d'une accessibilité aux sites réactifs considérablement diminuée par rapport au cas de la membrane.

Diverses expériences ont ainsi été réalisées sur 1g de mousse renfermant 15 unités théoriques de glucose oxydase et dont l'activité expérimentale est 12,5 unités. La mousse est dispersée dans 25ml de tampon phosphate 0,1M, pH 6,5 renfermant le glucose dont on va suivre la cinétique de disparition.

La formation éventuelle d'acide gluconique est contrôlée en effectuant un dosage acidimétrique comparatif

- sur le tampon seul
- sur la solution de glucose initiale
- sur la solution après contact de 24h avec la mousse en présence d'un énergique barbotage d'azote.

Les 2 premiers dosages sont évidemment identiques, le glucose n'ayant pas de propriétés acidobasiques ; dans tous les cas, le 3ème dosage aboutit exactement au même résultat que les 2 précédents or, suivant les expériences 10 à 100 µmoles de glucose ont disparu du milieu. Si elles s'étaient transformées en acide gluconique, ce dernier serait neutralisé par la même quantité de soude (soit 0,1 à 1ml de soude 10^{-1}M), quantités tout à fait appréciables). On peut donc conclure qu'il n'y a pas formation d'acide gluconique et qu'en conséquence le glucose éliminé de la solution ne peut être que complexé à l'enzyme, ce qui confirme une fois de plus les résultats acquis précédemment.

La cinétique de disparition du glucose à partir de différentes concentrations initiales est représentée sur la fig. (II.12). On voit que la concentration tend, pour chaque essai, vers une valeur constante qui dépend largement de la concentration initiale en glucose So à laquelle elle semble être directement proportionnelle -courbe (II.13)- tout au moins dans les limites de concentrations étudiées $1,2.10^{-3}M < So < 6.10^{-3}M$ qui correspondent à la mise en présence de 2 à 10 µmoles de D glucose pour 1 unité théorique d'enzyme. La quantité de D glucose disparu est alors suivant les expériences de 0,67 à 6,7 µmoles / unité théorique d'enzyme, ou 0,8 à 8 µmoles / unité expérimentale.

On voit donc que la limite de fixation établie dans le cas d'un écoulement continu sur mousse est uniquement d'origine cinétique et que l'accessibilité des molécules de D glucose aux sites réactifs est même supérieure à celle atteinte dans le cas des membranes(5 µmoles / UI) si l'on prolonge le temps de contact jusqu'à 24h.

Il aurait été intéressant de voir sous quelle forme le D glucose est maintenu dans la phase insoluble. Lors d'une étude approfondie du mécanisme de la glucose oxydase en solution, Swoboda et Massey ont en effet établi que le transfert d'électrons correspondant à l'oxydoréduction avait lieu dans le complexe suivant le processus :

$$E_{Ox} + \text{D Glucose} \rightleftarrows E_{Ox}.\text{D glucose} \rightleftarrows E_{Red}.\text{Gluconolactone} \longrightarrow E_{Red} + \text{Gluconolactone}$$

dans lequel E_{ox} et E_{Red} représentent l'enzyme sous forme oxydée ou réduite. Or l'oxydoréduction de l'enzyme se produit au niveau du cofacteur selon l'équilibre $FAD + H^+ + 2e \rightleftarrows FADH_2$ le spectre visible de la forme oxydée présente une raie à 450 nm qui disparaît après réduction et offre donc un moyen commode d'information quand au degré d'oxydation de l'enzyme et par conséquent quant à celui du substrat. Il n'a malheureusement pas été possible d'appliquer une telle technique au matériel - mousse ou membrane - dont nous disposions car celui-ci est opaque et absorbe totalement dans le visible même sous faible épaisseur (membrane). Il serait donc intéressant,

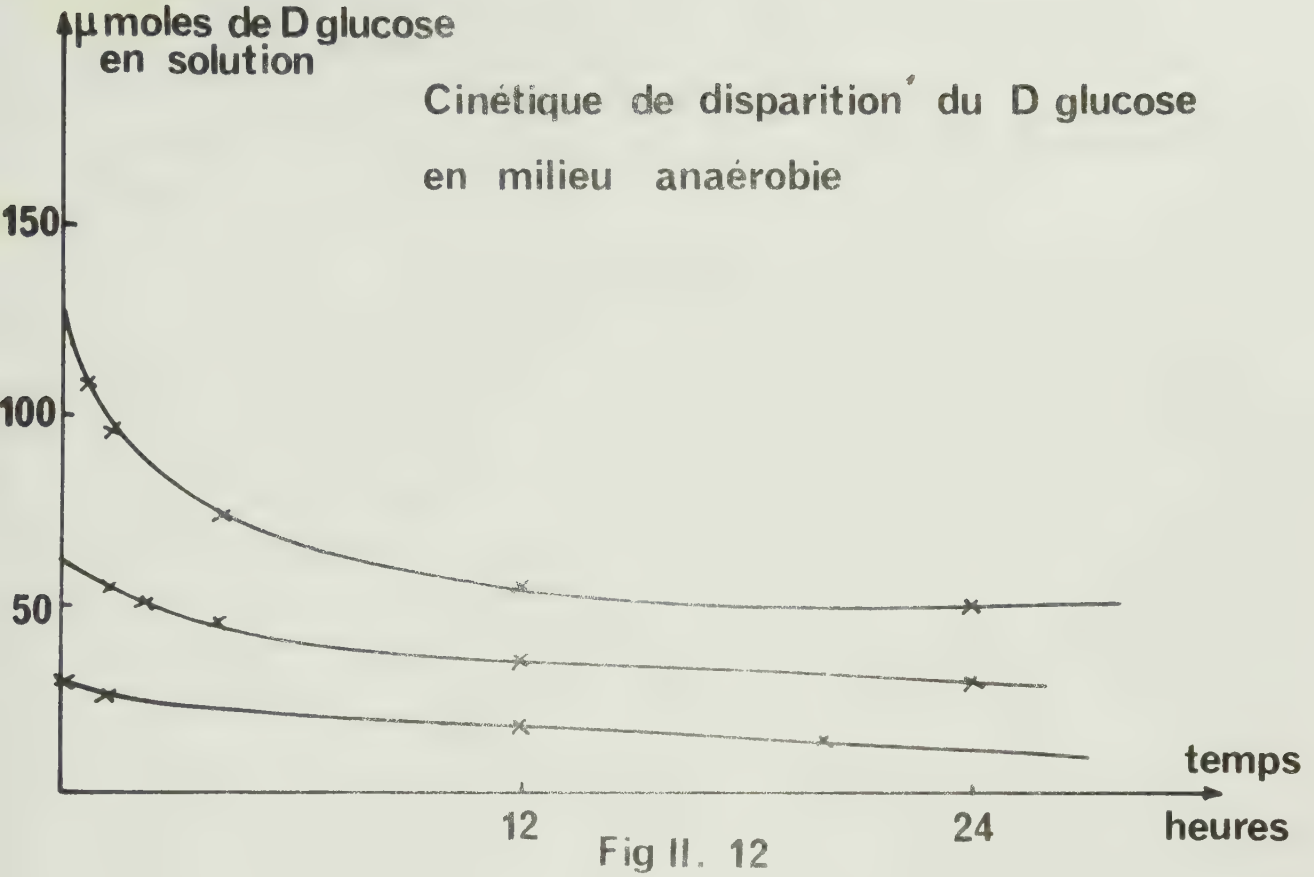


Fig II. 12

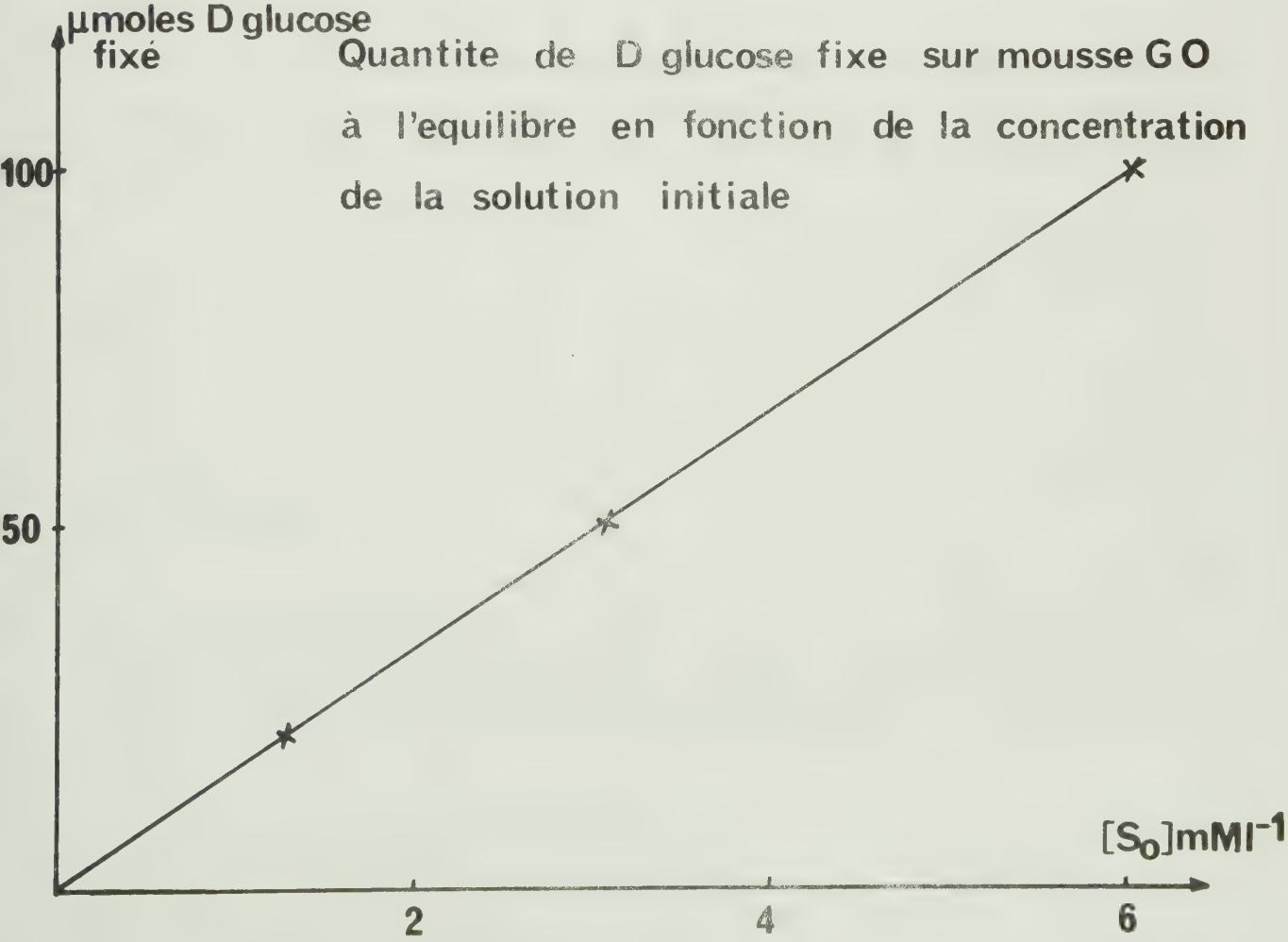


Fig II. 13

dans une étape ultérieure de nos recherches de mettre au point un support insoluble transparent à 450 nm qui permettrait d'utiliser la méthode spectrale ci-dessus et d'obtenir un complément d'information quant à la structure électronique du complexe.

II.1.4. Conclusion.

Les essais de séparation effectués à l'aide d'enzyme insolubilisée ne sont pas entièrement satisfaisants puisqu'ils ne permettent pas de récupérer le substrat comme on l'espérait au départ, tout au moins dans le cas de l'exemple choisi. Ils représentent toutefois sur les méthodes en solution le gros avantage de ne pas consommer d'enzyme ; il suffit, pour régénérer la colonne de la laver avec une solution tampon pH 6,5 dans laquelle on fait barboter de l'oxygène. La seconde partie de la réaction enzymatique soit

$$E.FADH_2 + O_2 \longrightarrow E.FAD + H_2O_2$$

se produit alors sans être freinée, comme dans le cas d'une réaction en solution, par accumulation d'eau oxygénée, ce produit étant ici éliminé au fur et à mesure de son apparition par écoulement de l'éluat.

La méthode permet donc de récupérer une solution appauvrie en substrat et presque pure en autre isomère grâce à un choix judicieux des quantités relatives d'enzyme et de substrat mises en présence.

Si la colonne de mousse ne contient pas assez d'enzyme pour que tout le D glucose soit éliminé en une seule étape, trois processus sont possibles :

1) ou bien opérer en milieu aérobie auquel cas on aura à la sortie de la colonne un mélange d'acide D gluconique résultant de l'oxydation du D glucose et d'ose inattaqué par l'enzyme,

2) ou bien repasser plusieurs fois le même échantillon sur la colonne en milieu anaérobie en alternant chaque passage avec une réoxydation de l'enzyme. On obtiendra alors une solution de sucre non attaqué débarrassée d'acide gluconique,

3) on peut encore passer sur la colonne en milieu anaérobie des fractions successives de l'échantillon à séparer, chaque fraction respectant la condition de sélectivité $\frac{\mu\text{moles de D glucose}}{\text{UI d'enzyme}} < 1$ et régénérer la colonne après passage de chacune de ces fractions.

On peut donc conclure à un succès partiel de la méthode préconisée qui sera en fait plus une méthode de purification qu'une méthode de séparation d'oses puisque le D glucose est finalement détruit. Notons toutefois que l'échec partiel enregistré ici est dû à une irréversibilité particulièrement marquée de la réaction de formation du complexe et qu'il est fort possible que d'autres systèmes enzymatiques permettent d'aboutir à de meilleurs résultats ; mais en raison de la complexité des réactions enzymatiques, il ne semble pas qu'il soit possible de généraliser les conclusions établies dans un cas particulier.

Il sera nécessaire, dans chaque cas, de redéterminer les conditions expérimentales exactes. Pour espérer aboutir à un succès, il faut choisir un système enzymatique pour lequel il soit possible de bloquer la réaction au stade de la formation du complexe par suite d'un choix judicieux des conditions opératoires.

II.2. Utilisation de la stéréospécificité de l'enzyme vis-à-vis d'un inhibiteur.

Il nous a, par ailleurs, paru intéressant d'essayer d'exploiter la stéréospécificité d'inhibition de certaines enzymes par des composés présentant une isomérie optique.

On sait en effet qu'une réaction enzymatique peut être inhibée par différents réactifs soit irréversiblement si l'inhibition est due à une dénaturation de la protéine enzymatique, soit réversiblement si l'action inhibitrice est due à la formation d'un complexe enzyme - inhibiteur qui pourra être détruit en modifiant les conditions expérimentales, la réaction

$$E + I \rightleftharpoons EI$$

étant réversible ; l'inhibiteur sera compétitif ou non suivant que sa liaison avec l'enzyme se produit ou non au niveau du site enzymatique. On conçoit donc que, particulièrement dans le cas d'un inhibiteur compétitif les critères stéréosélectifs

d'interaction enzyme - inhibiteur soient les mêmes que ceux de l'interaction enzyme - substrat. L'expérience démontre d'ailleurs que la structure d'un inhibiteur compétitif est souvent très voisine de celle du substrat intervenant dans la réaction inhibée.

La différence essentielle entre substrat et inhibiteur est que l'équilibre de complexation qui dans le cas du substrat est suivi d'une transformation irréversible en produit est la seule étape réactionnelle existant entre enzyme et inhibiteur. L'un des écueils les plus importants rencontré lors de l'utilisation dans un but séparatif du pouvoir stéréospécifique de l'enzyme vis-à-vis de son substrat se trouvera donc automatiquement éliminé en remplaçant ce dernier par un inhibiteur.

Nous avons donc recherché si certains énantiomères étudiés au cours de ce travail pouvaient jouer un rôle d'inhibiteur stéréospécifique vis-à-vis d'enzymes d'obtention commerciale facile.

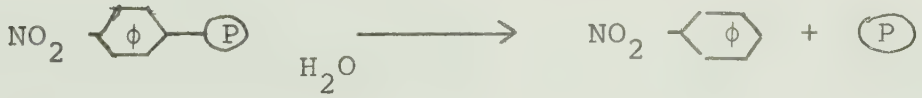
L'étude bibliographique (Kilsheimer et al. ; Nath ; Paul et al. ; Rosenkrantz) nous a conduit à éliminer certaines enzymes soit à cause de leur difficulté d'obtention soit par ce que l'inhibition stéréospécifique n'était valable que par un seul composé (cas de la phosphopyruvate carboxylase inhibée par le L malate), soit parce qu'un énantiomère était inhibiteur, l'autre étant le substrat (cas de la fumarate hydratase qui catalyse la réaction L malate $\rightleftarrows$ fumarate + H_2O mais est inhibée par le D malate ou le D tartrate).

Une enzyme nous a finalement paru répondre aux conditions fixées : la phosphatase acide.

La phosphatase acide catalyse l'hydrolyse en milieu acide d'un certain nombre de composés phosphorylés tels que le p-nitrophényl phosphate que nous avons choisi comme exemple pour caractériser notre enzyme.

La réaction enzymatique peut se schématiser par

ex :



De nombreuses études ont été effectuées sur des phosphatases d'origine prostatiques humaine ou animale et ont permis de conclure que ces enzymes étaient inhibées par un seul énantiomère de divers acides α hydroxycarboxyliques. L'inhibition compétitive par le L tartrate a en particulier été bien étudiée à des fins biologiques.

C'est ainsi que dans le cas d'une phosphatase extraite de prostate humaine, Kilsheimer et Axelrod obtiennent une inhibition de 50% de l'hydrolyse du p. nitrophénylphosphate en présence d'acide L (+) tartrique $1,6.10^{-3}$M ($K_I \sim 8,5.10^{-6}$M) alors que l'acide D (-) tartrique à même concentration reste sans effet.

Etudiant une phosphatase acide de prostate de rat Paul et Richardson démontrent que cette dernière peut être séparée en 2 isoenzymes dont l'une seulement est sensible à l'inhibition par le L (+) tartrate. Avant séparation, un milieu L (+) tartrate $1,6.10^{-3}$M provoque une inhibition de 26% et une augmentation de la concentration en tartrate jusqu'à 2.10^{-1}M n'apporte aucune amélioration dans le taux d'inhibition.

Il semble donc que l'inhibition observée varie largement suivant l'origine de l'échantillon de phosphatase utilisé vraisemblablement par suite de l'existence dans des proportions variables de différentes isoenzymes.

Nous disposions pour notre part de phosphatase acide de germe de blé d'origine commerciale (SIGMA).

Par suite de la diversité des résultats obtenus ci-dessus, et de la grande différence d'origine de notre échantillon par rapport à ceux, tous de provenance animale, étudiés par les différents chercheurs mentionnés, il nous a paru indispensable d'entreprendre une étude préalable de cette phosphatase acide de germe de blé afin d'en définir les caractéristiques.

II - 2.1. Détermination du K_M

Notre but n'étant pas d'étudier toutes les propriétés de l'enzyme dont nous disposions mais seulement d'utiliser son inhibition éventuelle

Tableau récapitulatif des valeurs de K_M et K_i obtenues dans les travaux sur l'inhibition par le L tartrate de la phosphatase acide.

(Substrat p. nitro ϕ phosphate - 37°C pH 5)

Origine Enzyme	K_M Moles.l^{-1}	K_I Moles.l^{-1}	[L tart] inhibition 50%	Type inhib.on
prostate humaine	$3,4.10^{-5}$	$8,5.10^{-6}$	1,6 mM	
prostate canine (suivant tampon et fraction)	$1,7.10^{-3}$ $4,2.10^{-3}$ $2,7.10^{-3}$ $2,1.10^{-3}$	$1,6.10^{-6}$		C
prostate de rat	α $5,2.10^{-3}$ β $1,45.10^{-3}$		0,2 M 24%	
nos exp.	$0,67.10^{-3}$	$4,5.10^{-2}$	40 mM	

Tableau II.6.

par les α hydroxyacides carboxyliques, nous n'avons utilisé qu'un seul substrat, le p.nitrophényl phosphate destiné à servir d'étalon de mesure aussi bien pour comparer l'activité de notre échantillon d'enzyme à celle de phosphatases acides d'origine animale que pour mesurer le degré d'inhibition.

La phosphatase acide SIGMA solide utilisée possède une activité théorique de 0,45 µ/mg. Nous avons effectué préalablement à toute expérimentation une vérification de ce point en réalisant l'hydrolyse d'une solution 0,0075 l^{-1} de paranitrophényl-phosphate en présence de quantités variables d'enzyme.

Les quantités d'hydrolysat obtenues en 15 et 30' (⟶ courbes II.14) nous ont amené à conclure que l'activité de l'enzyme était de 0,55 µ/mg soit légèrement supérieure à celle prévue ci-dessus.

Puis nous nous sommes assurés que les conditions expérimentales considérées comme optimales par Kilsheimer et Axelrod étaient utilisables dans notre cas.

Nous avons donc effectué une série d'expériences à 40°C en milieu tampon pH 5 (acétate 0,125 M) en suivant la formation de p. nitrophénol (absorptiométrie à 400 nm) au cours du temps (fig. II-15). Deux essais en partant de concentrations initiales, de substrat respectivement égales à 7,5 et 5 mmoles l^{-1} nous ont permis de nous assurer que la vitesse de réaction restait linéaire pendant au moins 30 minutes ; il sera donc facile d'atteindre la valeur de la vitesse initiale Vo à l'aide d'un seul prélévement inférieur à ce temps (15 minutes par exemple).

Cette détermination effectuée pour diverses valeurs de la concentration initiale en p. nitrophénylphosphate comprises entre 1 et 10 mM l^{-1} (tableaux II.7 et II.8) a permis de tracer les diagrammes de Lineweaver et Burk présentés sur la fig. II.16.

On voit que 2 expériences réalisées dans des conditions absolument identiques (seule la solution d'enzyme a été préparée extemporanément à partir de l'enzyme solide pour des raisons de conservation) aboutissent à la même valeur de la constante de Michaelis $K_M = 0,67.10^{-3} M\ l^{-1}$.

p.nitrophénol |=|P|
mMl^{-1}

l'hydrolyse du p. nitro φ phosphate

1mg d'enzyme 0,82 $mM\,l^{-1}$ |P| en 15'soit activité=0,55µmole min^{-1}/ mg

1,70 mMl^{-1} |P| en 30' ,, ,, =0,56

Fig.II.14

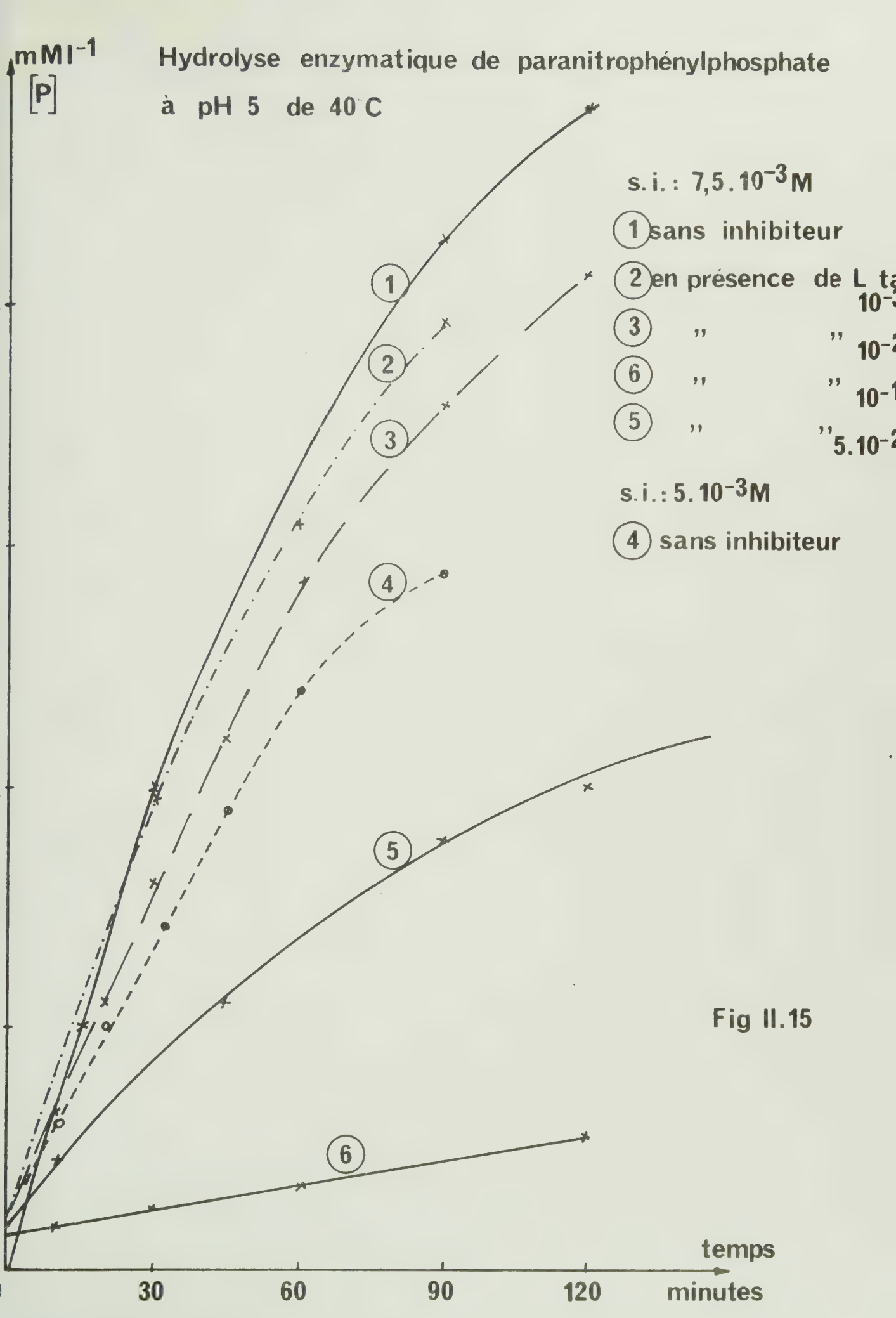

mMl⁻¹
[P]
Hydrolyse enzymatique de paranitrophénylphosphate
à pH 5 de 40°C
s.i. : 7,5.10⁻³M
1 sans inhibiteur
2 en présence de L ta
3 " " 10⁻
6 " " 10⁻²
5 " " 10⁻¹
" 5.10⁻²
s.i. : 5.10⁻³M
4 sans inhibiteur
1
2
3
4
5
6
temps
30
60
90
120
minutes

Fig II.15

S_o	$1/So\ M^{-1}P$	L Tart	P 15'	$Vo\ mM\ min^{-1}$	$1/Vo\ M^{-1}min$
10 mM	100	0	0,99 mM	$0,726.10^{-3}$	$1,37.10^{6}$
		$5.10^{-2}M$	0,52 "	0,385 "	2,60 "
		$2,5.10^{-2}M$	0,73	0,539 "	1,85
		$10^{-2}M$	0,86	0,627	1,59
5mM	200	0	0,94 mM	0,693	1,44
		$5.10^{-2}M$	0,45 m	0,33	3,03
		$2,5.10^{-2}M$	0,65	0,473	2,11
		$10^{-2}M$	0,81	0,594	1,68
4mM	250	0	0,92 mM	0,671	1,49
		$5.10^{-2}M$	0,42	0,308	3,24
		$2,5.10^{-2}M$	0,63	0,462	2,16
		$10^{-2}M$	0,78	0,572	1,74
3mM	333	0	0,90 mM	0,66	1,52
		$5.10^{-2}M$	0,40	0,297	3,36
2mM	500	0	0,81 mM	0,594	1,68
		$5.10^{-2}M$	0,35	0,253	3,95
		$2,5.10^{-2}M$	0,51	0,374	2,67
1mM	1000	0	0,63 mM	0,462	2,16
		5.10^{-2}	0,25	0,187	5,34
		$2,5.10^{-2}$	0,4	0,297	3,36
		10^{-2}	0,51	0,374	2,62

TABLEAU II.7.

S_o mM.l^{-1}	1/So M^{-1} l	(L tart) Solution préparée 24h avant exp.	$(P)_{15'}$ mM.l^{-1}	V_o mM.min^{-1}	$1/V_o$ M^{-1} min
10 mM	100	0	1,14	$0,84.10^{-3}$	$1,19.10^{6}$
		5.10^{-2}	0,985	0,72 "	1,32
		$2,5.10^{-2}$	1,09	0,80	1,25
		10^{-2}	1,12	0,82	1,21
5mM	200	0	1,08	0,79	1,26
		5.10^{-2}	0,90	0,66	1,51
		$2,5.10^{-2}$	0,95	0,70	1,43
		10^{-2}	1,01	0,74	1,35
3mM	333	0	1,05	0,77	1,29
		5.10^{-2}	0,79	0,58	1,72
		$2,5.10^{-2}$	0,88	0,645	1,55
		10^{-2}	0,94	0,69	1,4
2mM	500	0	0,91	0,67	1,5
		5.10^{-2}	0,69	0,51	1,96
		$2,5.10^{-2}$	0,76	0,56	1,78
		10^{-2}	0,82	0,60	1,67
1mM	1 000	0	0,685	0,50	2
		5.10^{-2}	0,52	0,38	2,63
		$2,5.10^{-2}$	0,565	0,41	2,43
		10^{-2}	0,625	0,46	2,17
0,5mM	2 000	0	0,425	0,31	3,22
		5.10^{-2}	0,335	0,25	4
		$2,5.10^{-2}$	0,375	0,275	3,64
		10^{-2}	0,395	0,29	3,44

TABLEAU II.8.

Par contre V_M varie d'une expérience à l'autre (0,78 µmole / min / échantillon et 0,89 µmole / min) ce qui prouve que l'échantillon d'enzyme solide dont nous disposons n'est pas parfaitement homogène. La valeur de K_M trouvée reste du même ordre de grandeur, bien que légèrement inférieure, à celles trouvées par divers chercheurs (tableau récapitulatif II.6) pour des phosphatases acides provenant de prostates de chien ou de rat mais est nettement différente de celle trouvée par Kilsheimer et Axelrod ; on peut donc à priori penser que notre échantillon se différenciera de la phosphatase acide utilisée par ces derniers auteurs plutôt que des échantillons d'autres origines.

II.2.2. Etude de l'inhibition de la phosphatase acide par les tartrates D, L et DL.

II.2.2. 1) Détermination de K_i

Parallèlement aux expériences ci-dessus, nous avons effectué une série de déterminations destinées à mettre en évidence l'existence éventuelle d'une inhibition par le L (+) tartrate. Les deux séries d'expériences (1) et (2) ont été réalisées à 24h d'intervalle à partir des mêmes solutions-mères. On peut tout d'abord remarquer que l'influence de l'addition de L tartrate est beaucoup moins marquée dans la 2ème série d'expériences.

Ceci rejoint l'observation faite par Kilsheimer quant à la nécessité d'opérer sur des solutions fraichement préparées, faute de quoi l'inhibition tend à disparaître.

Toutefois, bien que le taux d'inhibition soit assez différent pour une même concentration en tartrate d'une expérience à l'autre, on retrouve la même valeur de $\frac{1}{K'_M}$ donc de K'M.

Dans le cas de solutions fraichement préparées, les droites de Lineweaver et Burk établies en présence d'inhibiteur ne passent ni par le point $\frac{1}{V_M}$ ni par le point $\frac{1}{K_M}$ ce qui permet de conclure à une inhibition de type mixte.

Par contre ces mêmes droites tracées dans la 2ème série d'essais coupent toutes l'axe $\frac{1}{V_o}$ entre $1{,}1.10^{+6}$ et $1{,}2.10^{6}$, c'est-à-dire pratiquement au même point, compte tenu de la précision de l'expérimentation. Il semble donc alors que l'inhibition soit de type compétitif, conclusion qui rejoint celle des chercheurs précédemment cités.

2 séries d'expériences 1 et 2 dans les memes conditions de préparation

en absence d'inhibiteur

$K_M = 0{,}67.10^{-3} M l^{-1}$

exp. 1 $V_M = 0{,}78.10^{-6} M\,min^{-1}$

exp. 2 $V_M = 0{,}88.10^{-6} M\,min^{-1}$

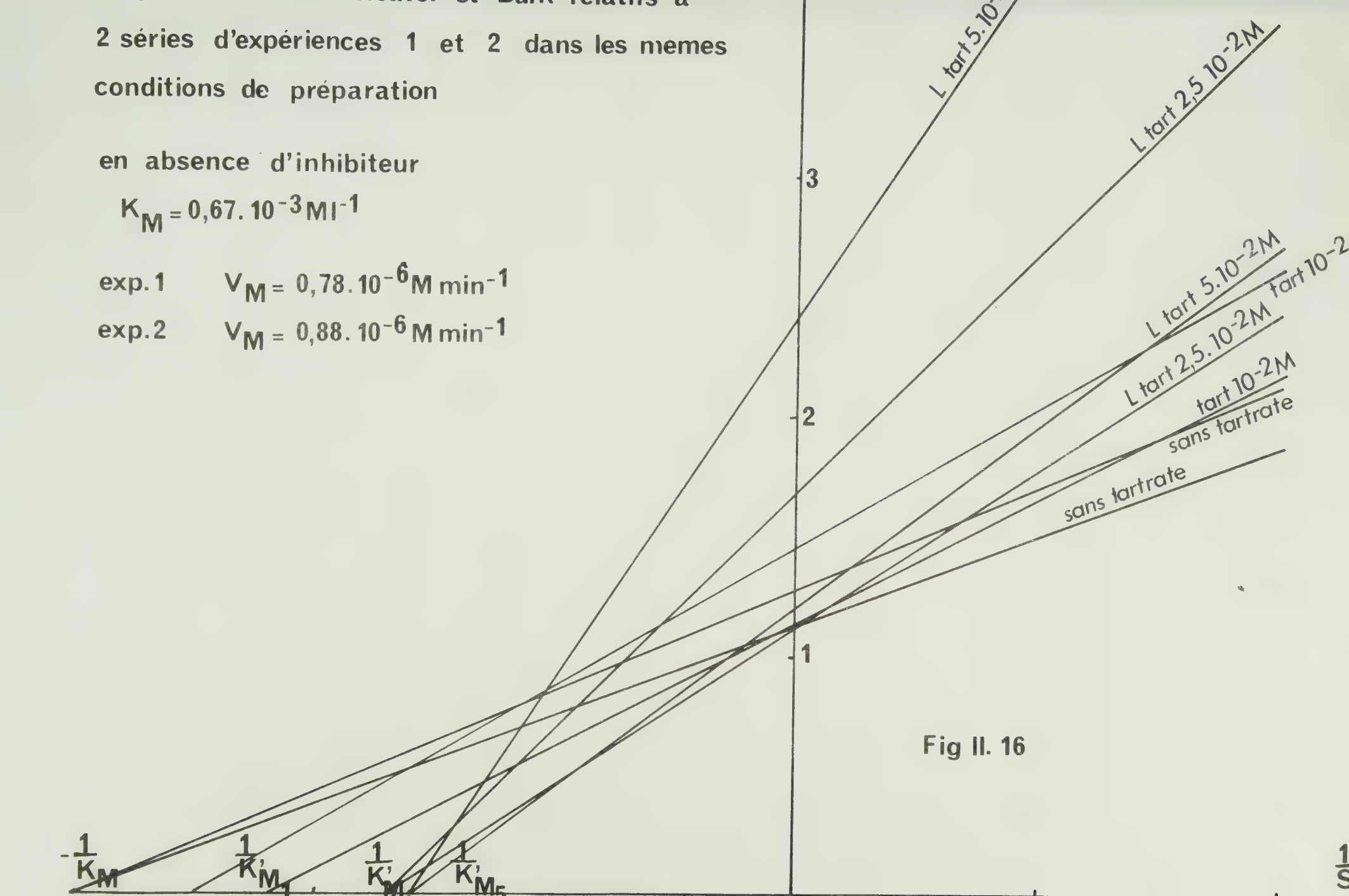


Fig II. 16

Si cette hypothèse est juste, chaque droite de Lineweaver et Burk en présence de tartrate, doit couper l'axe des abscisses en un point $\frac{1}{K'_M}$ tel que l'on ait :

$$K'_M = K_M \left(1 + \frac{L\ tart}{K_i}\right)$$

K_i étant la constante de dissociation du complexe EI, cette relation permettra de déterminer expérimentalement K_i et doit bien sûr aboutir à une valeur unique de ce coefficient pour les différents essais ; on aura en effet :

$$K_i = \frac{L\ tart}{\left(K'_M / K_M\right) - 1}$$

Les valeurs expérimentales obtenues rassemblées dans le tableau II.9 permettent d'établir l'ordre de grandeur de K_i soit : $K_i \sim 4{,}5.10^{-2}$

L tart	$1/K'_M$	$\frac{K'_M}{K_M}$	$K_i = \frac{L\ tart}{\frac{K'_M}{K_M} - 1}$
10^{-2}	1160 à 1250	1,3 à 1,2	$3{,}3.10^{-2}$ à 5.10^{-2}
$2{,}5.10^{-2}$	850	1,76	$3{,}3.10^{-2}$
5.10^{-2}	800	1,88	$5{,}7.10^{-2}$

Tableau II.9.

Cette valeur est beaucoup moins favorable à notre propos que celle de l'ordre de 10^{-6}M trouvée dans le cas de phosphatases acides d'origine animale ; elle reste toutefois favorable à la formation du complexe, c'est pourquoi nous avons poursuivi l'expérimentation dans le but de déterminer le taux d'inhibition obtenu à partir d'une concentration donnée d'inhibiteur.

II.2.2. 2) Détermination du taux d'inhibition.

Afin de tracer les abaques d'inhibition pour des temps variables de réaction, nous avons mis en oeuvre l'expérience suivante :

dans une série de tubes à essai nous avons préparé 10ml de solution tampon acétate pH 5 renfermant

- du paranitrophénylphosphate $7,5.10^{-3}$M
- du L tartrate en concentrations croissantes de 0 à 10^{-1}M suivant les tubes.

La réaction enzymatique est démarrée par addition de 1ml de solution d'enzyme à 1,25 mg/ml. Des prélèvements effectués à intervalles réguliers entre 0 et 2h permettent de tracer

- d'une part les courbes de variation (p nitrophénol) = f(t) (fig. II.15) et de vérifier que, même en présence d'inhibiteur la vitesse de réaction reste constante pendant au moins 30 minutes et même souvent plus.

- d'autre part, les courbes de variation (p nitrophénol) = f (Log (L tart)) pour chacun des temps de prélèvement.

On obtient ainsi les abaques présentées fig. II.17. qui démontrent que le taux d'inhibition est constant au cours du temps si l'on ne tient pas compte de la courbe 15' pour laquelle les concentrations de produit formé sont assez faibles et par suite déterminées avec une précision inférieure aux suivantes.

On voit donc que, pour qu'une inhibition notable apparaisse, il faut que la concentration en L tartrate soit supérieure à 10^{-3}M. On obtient une inhibition de 50% pour une concentration en L tartrate 4.10^{-2} M l^{-1} soit 25 fois supérieure à celle permettant d'atteindre le même résultat dans le cas de la phosphatase acide de prostate humaine (toutes les autres conditions opératoires étant les mêmes). Une concentration en L tartrate $1,6.10^{-3}$M ne provoquera ici qu'une inhibition de 7%.

L'inhibition ne se manifestera donc que si la concentration initiale en L tartrate est au moins du même ordre de grandeur que K_I.

Inhibition de la phosphatase acide (Boehringer)

par le L tartrate

conc
p.nitro
mMl⁻¹

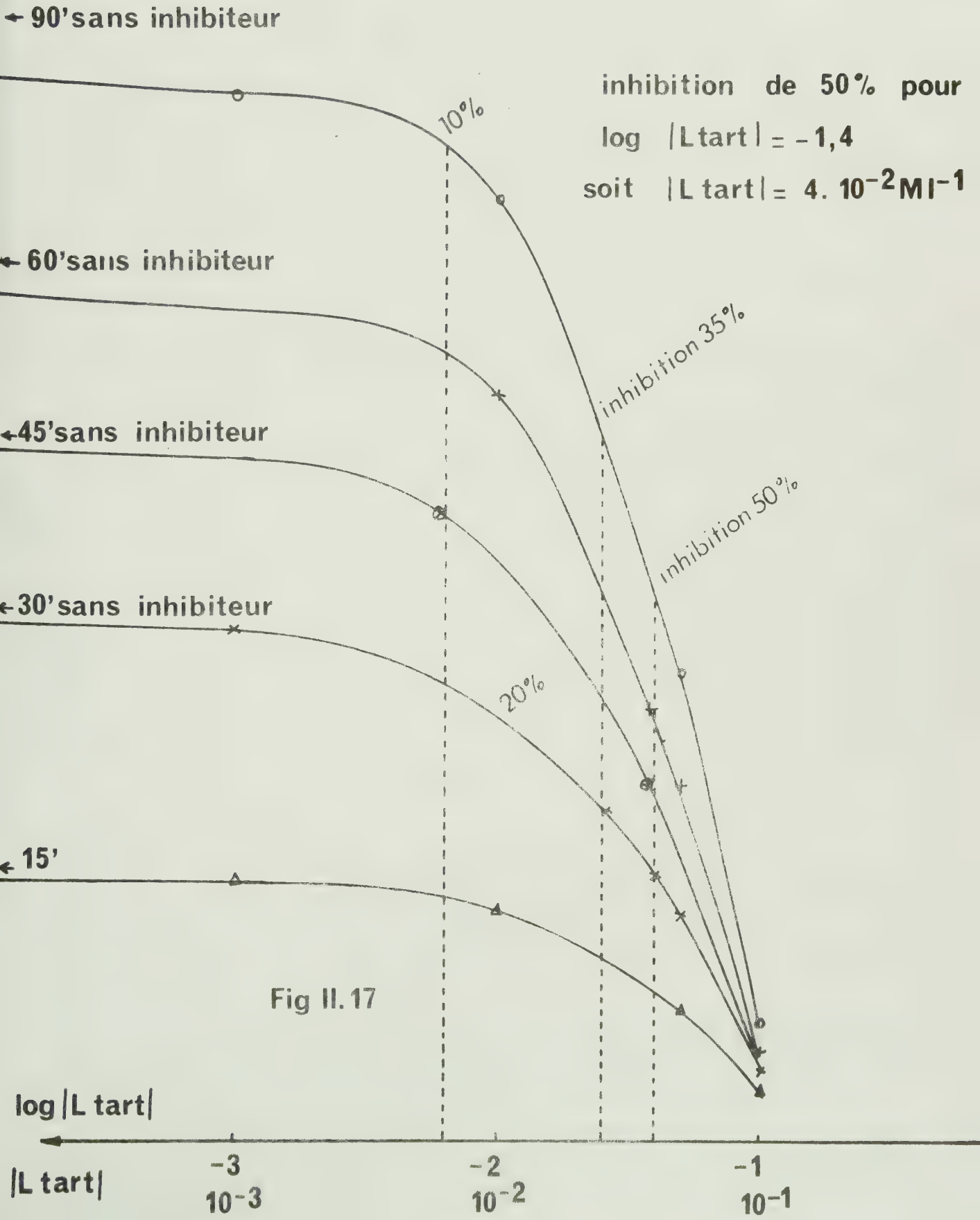


Fig II. 17

II.2.2. 3) Action du D tartrate

Après avoir mis en évidence l'existence d'une inhibition par le L (+) tartrate nous avons vérifié que le D (-) tartrate n'avait pas la même action que son énantiomère sur l'hydrolyse enzymatique du p. nitrophénylphosphate.

Nous avons donc préparé un certain nombre de solutions de p. nitrophénylphosphate 7,5 mM, renfermant du D tartrate à diverses concentrations toujours supérieures à 10^{-3}M, seuil d'action du L tartrate. Toutes ces solutions contiennent en outre des ions acétate 0,125 M et sont maintenues à pH 5 afin de ne modifier aucune condition de réaction autre que la quantité de tartrate.

Les résultats obtenus, rassemblés dans le tableau II.10.

D tart. Me^{-1} pH		0 5,06	2.10^{-2} 5,04	4.10^{-2} 5,04	8.10^{-2} 5,05	$10.^{-1}$ 5,05	$1,5.10^{-1}$ 5,05	2.10^{-1} 5,05
mMl^{-1} Produit formé en :	15'	1,13	1,08	1,05	0,96	0,94	0,89	0,89
	30'	2	1,79	1,71	1,59	1,53	1,51	1,35
	90'	4,20	4,11	3,84	3,77	3,66	3,60	3,46
taux d'inhibition 0%	15'		5	7	15	17	21	21
	30'		10	14	20	23	25	32
	90'		3	9	10	13	14	18

Tableau II.10.

permettent d'aboutir aux conclusions suivantes :

1°) Contrairement aux observations faites sur la phosphatase acide de prostate humaine, la présence de D tartrate provoque une légère inhibition de l'hydrolyse enzymatique de la liaison aryl-phosphate.

2°) Cette inhibition reste toutefois très nettement inférieure à ce qu'elle serait en présence de la même quantité de L tartrate puisque l'introduction dans le milieu de D tartrate en concentration 10^{-1}M n'aboutit qu'à une inhibition de 20 à 30% alors que la même quantité de L tartrate conduirait à une inhibition de 90% au moins.

Nous avons tout de même là, par rapport à ce que laissaient espérer les résultats obtenus par d'autres chercheurs, un facteur qui paraît défavorable à notre but séparatif ; partant d'un mélange racémique d'acide tartrique, il ne sera pas possible de fixer sélectivement mais seulement préférentiellement l'isomère L sur l'enzyme ; l'existence d'une inhibition par le D tartrate ne peut en effet s'expliquer que par la formation d'un complexe enzyme-D tartrate qui entrera en compétition avec celle d'un complexe enzyme-L tartrate. On peut simplement supposer que l'énantiomère L, beaucoup plus fortement inhibiteur, se fixe plus facilement que son inverse optique sur l'enzyme. Nous allons vérifier cette hypothèse sur quelques essais à partir de DL tartrate.

II.2.2. 4) Inhibition par le DL tartrate.

En suivant l'évolution de l'hydrolyse de p.nitrophényl phosphate en solution 7,5 mM en présence de tartrate racémique en quantité plus ou moins grande, on aboutit aux résultats suivants :

DL tart $M l^{-1}$		0	2.10^{-2}	$7,5.10^{-2}$	10^{-1}	2.10^{-1}
Quantité de produit en mM formées en :	10'	0,7	0,6	0,5	0,34	0,2
	20'	1,2	1,05	0,9	0,55	0,3
	30'	1,9	1,6	1,3	0,75	0,4
	45'	2,6	-	1,7	1	0,4
	60'	3,2	2,8	2,15	1,15	0,5
	90'	4,2	-	2,7	1,45	0,6
	120'	-	-	3,3	1,75	0,75
Taux d'inhibition %		0	12	35	65	85
|L tart| provoquant la même inhibition.			$0,7.10^{-2}$	$2,5.10^{-2}$	$5,75.10^{-2}$	$9,1.10^{-2}$

Tableau II.1.

Il semble donc que l'inhibition obtenue par le DL tartrate soit essentiellement dû au seul L tartrate ; la quantité de L tartrate pur qui provoquerait la même inhibition est même légèrement inférieure à celle effectivement introduite sous forme de racémate . Ceci conduit donc à supposer que, si l'un et l'autre des 2 inverses optiques considérés sont susceptibles, isolément, de former un complexe avec l'enzyme, l'isomère L donnant le complexe le plus stable se fixera presque sélectivement sur l'enzyme lorsqu'ils entrent en compétition. Une telle hypothèse constituerait un facteur extrêmement favorable à une séparation des 2 isomères dans la mesure toutefois où la quantité de complexe formé est suffisamment grande par rapport aux quantités d'ions tartrique restant en solution.

Nous avons donc entrepris deux séries d'essais de résolution de racémique.

- l'une en solution, l'enzyme étant contenue dans un tube de dialyse
- l'autre après insolubilisation de l'enzyme dans une membrane d'agarose.

II - 2.3. Essais de Résolution de tartrate racémique .

II - 2.3.1 A l'aide de phosphatase acide en solution.

Ces essais ont été conduits en plongeant un tube de dialyse en cellulose (tube Visking de diamètre 6,3mm) renfermant 2ml de solution de phosphatase acide dans 20ml de solution DL tartrique. Les deux solutions sont tamponnées à pH 5 (tampon acétate 0,125M) et l'ensemble est thermostaté à 40°C, conditions optimales d'inhibition. Le diamètre moyen des pores de la paroi de dialyse est de 24Å; les ions tartrate pourront donc diffuser à l'intérieur du tube tandis que les molécules protéiques trop grosses, ne pourront diffuser vers l'extérieur. Si la préparation enzymatique ne contient pas

d'impuretés à caractère acido-basique, un dosage acidimétrique de la solution extérieure devrait permettre d'atteindre la quantité totale de tartrate ayant disparu de la solution et s'étant fixée sur l'enzyme au bout d'un temps de réaction donné ; un dosage polarimétrique (effectué suivant la technique décrite en annexe II-1.3.2.) pourra déceler la présence éventuelle d'un excès d'énantiomère D ou L en solution.

Un essai de dialyse simple de tartrate racémique en absence d'enzyme permet de s'assurer :

- que l'équilibre de dialyse est atteint en moins de 24h, temps de réaction choisi
- que le tartrate ne se fixe pas sur la paroi du tube de cellulose.

D'autre part, un essai de dialyse de la solution enzymatique contre le tampon acétate pur permet de vérifier que la milieu réactionnel ne provoque pas de dégradation partielle de la protéine et en particulier qu'il n'y a pas passage en solution de L amino acides doués de pouvoir rotatoire.

Deux séries d'essais ont été réalisées en mettant des solutions de tartrate racémique à diverses concentrations en présence de 2ml de tampon contenant une quantité donnée de phosphatase acide :

10mg - soit 4,5 uI théoriques pour la 1ère série
100mg - soit 45 " " " la 2ème "

Les dosages effectués sur les solutions extérieures conduisent aux résultats, rassemblés dans le tableau II-12 qui montrent que :

1 les quantités de tartrate fixées varient aussi bien avec la concentration initiale de tartrate qu'avec la quantité d'enzyme présente sans être toutefois directement proportionnelles ni à l'une ni à l'autre. Dans l'essai I, les quantités de tartrate fixées dépendent surtout de la concentration initiale en tartrate : on fixe en moyenne 4% seulement

	DL tartrate en solution		DL tart complexé	$(\alpha°/cm)\times10^3$	Excès d'énantiomère L en solution	
	Q_o µmoles / tube	Q_{24} µmoles /tube	$Q_{comp.}$ µmoles /tube	(λ = 400 nm)	µmoles /tube	% tart. total
Essai I 10 mg d'enzyme / tube	1 000	962	38	- 1,5	1	∿ 0,1
	750	725	25	"	"	0,15
	500	444	56	"	"	0,2
	250	204	46	- 29	21	10
	190	164	26	- 2	1,5	1
	150	144	6	"	"	1
	100	96,2	3,8	"	"	1,5
	50	47,6	2,4	- 2,5	2	4
	25	24	1	- 1,5	1	4
Essai II 100mg d'enzyme / tube	1 000	856	144	- 13,5	11	∿ 1
	750	682	68	- 15	12	2
	500	423	77	- 13	10,5	2,5
	250	195	55	- 15	12	6
	100	39	61	- 13	10,5	25

TABLEAU II.12.

de la quantité totale ce qui est très faible et ne pourra de toute façon pas déboucher sur une séparation valable. Dans l'essai II, la quantité de tartrate fixée est relativement constante : elle parait donc être indépendante de la concentration initiale en tartrate et être limitée par la quantité d'enzyme disponible.

2) Contrairement à ce que les expériences d'inhibition conduisaient à prévoir, toutes les solutions ont un pouvoir rotatoire négatif qui correspond à un excès en solution de l'énantiomère L, c'est donc que l'énantiomère D s'est fixé préférentiellement sur l'enzyme. Cet excès parait d'ailleurs être lié directement à la quantité d'enzyme présente : il est en moyenne de 1 µmole / tube pour l'essai I (une seule expérience sort du cadre de cette moyenne) et de 10 µmoles/ tube pour l'essai II ce qui représente 1 µmole de D tartrate excédentaire / 10mg d'enzyme.

Ce résultat peut s'interpréter en admettant que si le L tartrate se fixe plus facilement que son antipode soit sur le site enzymatique lui-même soit au voisinage de celui-ci, entrainant ainsi une inhibition plus marquée de l'hydrolyse normalement catalysée par la phosphatase acide, le D tartrate peut très bien se fixer en un ou plusieurs autres points de la chaîne protéique -par exemple au niveau d'amino-acides à chaîne latérale basique- mais suffisamment éloignés du site enzymatique pour que cette fixation ne modifie pas la réaction enzymatique.

De plus, la phosphatase acide utilisée contient des traces de lipase autre protéine sur laquelle il se pourrait qu'il y ait fixation d'acide tartrique -D ou -L.

La bilan global de la fixation conduit à un excédent de 10^{-1} µmole de D tartrate / mg d'enzyme qui paraît être indépendant de la concentration initiale en tartrate. (dans les limites $c = 5.10^{-2}$ Ml^{-1} à $c = 1,25.10^{-3}$ Ml^{-1}).

On obtiendra donc un enrichissement de la solution en énantiomère L, d'autant plus marqué que la solution racémique initiale est plus diluée mais les possibilités de séparation restent toutefois très limitées.

Pour essayer d'interpréter théoriquement le résultat obtenu, il faudrait connaitre exactement la structure de la phosphatase acide utilisée afin d'étudier quels sont les sites de fixation possibles pour un hydroxyacide et de mettre en évidence l'influence de la configuration de chaque inverse optique sur les possibilités de fixation. Or cette structure comme celle de la plupart des enzymes, n'est pas connue et il n'est pas possible d'entreprendre une telle détermination dans le cadre de ce travail ; celle-ci nécessiterait des recherches fort longues et faisant appel à une haute spécialisation par suite de la complexité de la macromolécule à étudier. Il ne parait donc pas possible de pousser plus avant nos investigations.

Avant de clore cette série d'essais sur phosphatase acide en solution nous avons toutefois essayé de détruire l'association phosphatase acide - DL tartrate obtenue en plaçant chaque tube de dialyse résultant des essais précédents -et contenant en principe le complexe enzyme tartrate dans 2ml de solution tampon acétate avec une quantité variable de tartrate- dans 20ml de solution à concentration de tartrate nulle. Les ions tartrique diffuseront vers l'extérieur du tube de dialyse et leur dilution devrait entrainer la dissociation du complexe enzyme tartrate.

Cet essai de dilution a été réalisé un peu différemment dans le cas des essais I et II du tableau II.12.

- Pour l'essai I les tubes de dialyse ont été plongés dans 20ml de tampon acétate à 20°C. Les dosages effectués au bout de 48h sur la solution extérieure permettent de retrouver le tartrate en solution mais rien de plus. Le complexe enzyme - tartrate parait donc stable dans le milieu acétate.

- Pour l'essai II les tubes de dialyse ont été plongés dans 20ml d'eau bidistillée et maintenus 48h à 4°C. Les dosages acidimétriques montrent qu'il y a alors dissociation partielle du complexe enzyme - tartrate.

Par contre dans l'un et l'autre cas les dosages polarimétriques démontrent qu'il n'y a aucun excès d'énantiomère D ou L décelable en solution donc que l'excès de D tartrate fixé sur l'enzyme ne repasse pas en solution (tableau II.13.)

	Tartrate présent dans le tube de dialyse (µmoles)			Tartrate en solution après dialyse (µmoles/tube)
	En solution	+ lié à l'enzyme	= Σ	
Essai I : dialyse contre acétate à 25°C	87	38	125	82
	66	25	91	70
	40	56	96	69
	18	46	64	22
	15	26	41	13
	13	6	19	13
	9	3,5	12,5	10
	4	2,5	6,5	0
	2	1	3	0
Essai II : dialyse contre l'eau à 4°C	78	144	221	191
	62	68	130	84
	38	77	115	78
	18	55	73	72
	3,5	61	64,5	54

TABLEAU II.13.

Récupération du tartrate lié à l'enzyme par effet de dilution de la solution extérieure.

Il n'est pas possible de poursuivre plus loin l'investigation dans ce sens car une nouvelle mise en contact de chaque tube de dialyse avec 20ml d'eau bidistillée conduit au bout de 24h à une variation d'acidité pratiquement nulle (< 1 µmole / tube).

Les résultats obtenus en solution sont donc au total peu concluants et, de plus, ne découlent pas des propriétés inhibitrices comparées des ions D et L tartriques puisque l'enzyme marque une affinité légèrement plus grande pour celui des 2 ions qui possède le pouvoir inhibiteur le plus faible.

II.2.3. 2) Cas de la phosphatase acide insolubilisée.

Bien que les résultats présentés au paragraphe précédent ne soient pas très encourageants, nous avons tout de même effectué deux expériences en présence de phosphatase acide insolubilisée par coréticulation avec de l'agarose ; l'insolubilisation de l'enzyme entraine en effet un certain nombre de modifications de la structure protéique qui pourraient se traduire par une différence de comportement face aux 2 énantiomères de l'acide tartrique par rapport au cas précédent.

A partir d'une solution contenant 0,35g d'agarose et 42,5mg soit 17 UI théoriques de phosphatase acide on obtient une membrane que l'on stabilise par pontage au glutaraldéhyde et dont les caractéristiques sont :

surface 50 cm^2
épaisseur 3.10^{-2} mm.

Une détermination expérimentale d'activité permet de retrouver 13 UI soit 70% de l'activité enzymatique théoriquement introduite.

La membrane est alors plongée dans 20ml de tartrate 5.10^{-2}M à pH 5. Un dosage acidimétrique effectué au bout de 24h fait apparaître pour 2 membranes de caractéristiques identiques, une fixation de :

160 µmoles de DL tartrate pour l'une,
110 µmoles de DL tartrate pour l'autre.

Il y a donc une certaine hétérogénéité dans la quantité globale de tartrate fixée lorsqu'on passe d'une membrane à l'autre qui peut s'expliquer par une différence de réticulation, laquelle serait d'ailleurs sans influence sur l'activité enzymatique qui, elle, n'a pas varié.

Par contre les 2 solutions ont un pouvoir rotatoire rigoureusement nul ; il n'y a donc aucune fixation préférentielle de l'un ou l'autre des inverses optiques sur la phosphatase acide, alors que, si les résultats obtenus en solution étaient applicables à la membrane on aurait dû trouver un excès de 3 à 4 µmoles de L tartrate en solution dans chaque essai.

Chaque membrane est ensuite plongée dans 20ml d'eau distillée à 4°C pendant 48h ; au bout de ce temps on récupère 140 µmoles de DL tartrate pour la 1ère et 105 µmoles pour la seconde, ces 2 solutions ne possédant encore aucun pouvoir rotatoire.

Ces essais aboutissent donc à un échec total des séparations de DL tartrate à l'aide de phosphatase acide insolubilisée qui conduisent à admettre que le site sur lequel il y avait fixation préférentielle de D tartrate en solution ne réagit plus soit par suite d'une difficulté d'accès due à la réticulation soit parceque le groupement sur lequel se fixait le D tartrate excédentaire est engagé dans une liaison avec l'agarose lors de la préparation de la membrane.

II.2.4. Conclusion.

Il ne semble pas au terme de cette étude qu'il soit possible d'exploiter, comme nous l'avions initialement espéré, l'inhibition stéréosélective d'une enzyme par un seul énantiomère d'un composé asymétrique pour séparer les 2 inverses optiques du composé considéré à l'aide de cette enzyme.

En effet, l'étude comparée de l'inhibition de la phosphatase acide de germe de blé par les L et D tartrates met en évidence un pouvoir inhibiteur beaucoup plus marqué dans le cas du L tartrate qui ne peut s'expliquer que par une fixation préférentielle de cet énantiomère au niveau ou au voisinage du site enzymatique. Or l'application de ce résultat à des essais de séparation de tartrate racémique par contact avec de la phosphatase acide conduit :

- soit à un échec total si l'enzyme est insolubilisée par coréticulation avec de l'agarose : il y a alors fixation de quantités équivalentes des 2 inverses optiques sur la membrane

- soit au résultat inverse de celui attendu si l'enzyme est en solution : on fixe alors un léger excès de D tartrate- c'est-à-dire de l'ion le plus faiblement inhibiteur. Cet excès est indépendant de la concentration en tartrate mais est proportionnel à la quantité d'enzyme présente : 0,1 µmole / 1mg (0,4 UI) d'enzyme.

On est donc conduit à admettre que si le site enzymatique -ou son voisinage- fixe préférentiellement le L tartrate, il existe sur la protéine enzymatique d'autres points de fixation possible qui eux, fixent préférentiellement le D tartrate. Ces points de fixation pourraient par exemple se situer au niveau d'aminoacides à fonction latérale basique suffisamment éloignés du site enzymatique pour qu'une modification de leur structure n'influence pas le déroulement de la réaction normalement catalysée par l'enzyme.

Il semble donc que la stéréospécificité de l'inhibition soit l'image des possibilités de fixation stéréosélective au niveau du site enzymatique mais non sur l'ensemble de la protéine si bien qu'elle n'entrainera pas automatiquement une possibilité de séparation. Seule une connaissance parfaite de la structure de l'enzyme pourrait permettre de prévoir à priori quelles seront les possibilités de fixation par la détermination du nombre de points de fixation éventuelle et par la comparaison, pour chacun d'entre eux des possibilités de liaison existant pour chaque inverse optique. Dans l'état actuel de nos connaissances l'inhibition stéréosélective constitue seulement un facteur favorable et seule l'expérience peut dire si le bilan sera ou non positif. Dans l'exemple choisi ici il se trouve que la stéréospécificité du site enzymatique pour l'énantiomère L est compensée par une stéréospécificité inverse en d'autres points de la protéine si bien que le bilan est nul et aboutit à un échec de tout essai de séparation.

II.3 Bibliographie

AVRAMEAS S. ; Immunochem. 1969, 6, 43

AVRAMEAS S. ; BROUN G. ; SELEGNY E. et THOMAS D.
a Fr. Pat. 2, 028, 722, 1968
b U S. Pat. 286, 233(5.9.1972)

BAUMAN E.K. ; GOODSON L.H. ; GUILBAULT G.G. et KRAMER D.N.
Anal. Chem. 1965, 37, 1378

BROUN G. ; SELEGNY E. ; AVRAMEAS S. et THOMAS D.
Biochem. Biophys. Acta 1969, 185, 260

GIBSON Q.H.; SWOBODA B.E.P et MASSEY V.
J. of Biol. Chem. 1964, 11, 239

GOLDMAN R.; KEDEM O.; SILMAN H.; CAPLAN S.R. et KATCHALSKI E.
Biochem. 1968, 7, 486

GRUBHOFER N.; SCHLEITH L.;Naturwiss. 1953, 40, 508

HICKS G.P.; UPDIKE S.J. Nature 1967, 214, 986

HIRAMOTO MINORU; Japan 70,11, 113 (C136D25)21 ap. 1970
Appl. 10 nov. 1967

HORNBY W.E.; LILLY M.D.; CROOK E.M.
Biochem. J. 1966, 98, 420
" " 1968, 107, 669

KILSHEIMER G.S.; AXELROD B.; J.B.C. 1957, 227, 871

KUDO S.; HISAYA H. ;Japan 68, 15, 401 (C1 16 B 65)
28 june 1968 Appl. 25 Ag. 1966

LASER H. Proc. Roy. Soc. 1952 B 140, 230

LEVIN Y.; PECHT M.; GOLDSTEIN L.; KATCHALSKI E.
Biochem. 1964, 3, 1905

MANECKE G.; SINGER S. a Makromol. Chem. 1960, 39, 13
" ; GUENZEL G.b " " 1962, 51, 199
" ; FOERSTER H.J.c " " 1966, 91, 136
" " d Naturwiss. 1967, 54, 531
" " e " 1967, 54, 647
" ; GUENZEL G.;FOERSTER H.J. f J. Pol. Sci. 1970, 30, 607

MASSEY V.; GIBSON Q.H.; Federation Proc. 1964, 23, 18

MITZ M.A.; SUMMARIA L.J. Nature, London 1961, 189, 576

MOSBACH K.; MOSBACH R. Acta Chem.Scand. 1970, 24, 2804

NATH R.L.; Ann. N.Y. Acad. Sc. 1969, 166 art.2, 653

PAUL S.E.; RICHARDSON K.E.; Invest. Urol. 1969, 7(3)232

ROSENKRANTZ H.; CHIN T.;Invest. Urol. 1970, 8(2)215

SCHMITT J.H.; ZENK M.H.; Proc. Int. Conf.Methods Prep. Ster. Label Comp. 2nd 1966 Pub. 1968, 305

SELEGNY E. Some systems coupling enzymic reactions and other phenomena ; SELEGNY ed. Polyelectrolytes D. REIDEL Publ. Co. Dordrecht Hollande 1974

SELEGNY E.; AVRAMEAS S.; BROUN G.; THOMAS D. aC.R. Acad. Sc. Paris 1968,266 série C 1431

SELEGNY E.; BROUN G.; THOMAS D. C.R. Acad. Sc. Paris 1969, 269, série D, 1330

SLATER ; Disc. Far. Soc. 1955 n°20, 231, 308

SWOBODA B.E.P.; MASSEY V.; J;of Biol. Chem. 1965 240(5)2209

THOMAS D. Thèse d'état n°CNRS AO 5407 (Rouen 1971)

THOMAS D.; BROUN G.; SELEGNY E.a Biochimie 1972, 54, 229

" " " b J.Memb.Biol.1972, 8, 313

TOSA T.; MORI T.; FUSE N.; CHIBATA I.

a Enzymologia 1966, 31, 225

b " 1967, 32, 153

c Biotech.Bioeng. 1967, 9, 603

d Biol. Chem. 1969, 33, 1047

WEETALL H.H.; Bioch. Biophys. Acta 1970, 212, 1

WEIBEL M.K.; BRIGHT H.J. Biochem. J. 1971, 124, 801

RESUME ET CONCLUSION

Nous avons, dans ce travail, effectué l'étude des conditions eventuelles de séparation des énantiomères d'un racémique au moyen de deux types de macromolécules chirales insolubles, l'un synthétique, l'autre biologique.

- à partir de polystyrène chlorométhylé, plus ou moins ponté au divinylbenzène et aminé à la D (-) désoxyéphédrine, nous avons essayé de séparer les antipodes d'hydroxyacides de la série succinique renfermant 1 ou 2 C asymétriques (acides malique et tartrique respectivement).

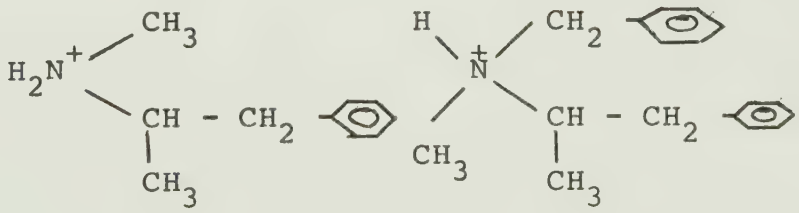
- à partir de protéines enzymatiques nous avons essayé d'effectuer des séparations soit d'hexoses soit des inverses optiques des mêmes hydroxyacides que ci-dessus en basant notre étude sur la stéréosélectivité de l'enzyme vis-à-vis soit de son substrat (glucose oxydase - D glucose) soit d'un inhibiteur de la réaction catalysée par l'enzyme (phosphatase acide - L tartrate).

Etude polarimétrique en solution (Chapître I)

La mesure du pouvoir rotatoire de solutions aqueuses renfermant 1 énantiomère d'hydroxyacide et 1 énantiomère d'amine a été faite pour les acides malique et tartrique et pour deux amines :

- l'une, secondaire, la désoxyéphédrine (I) qui était la petite molécule chirale que l'on désirait fixer sur le polystyrène

(I)



(II)

- l'autre, tertiaire, la N benzyl-désoxyéphédrine (II)), représentant le motif asymétrique présent dans le polymère.

Pour chaque couple acide - amine, on se trouve donc en présence de 4 types de solutions :

D amine - D acide
D amine - L acide
L amine - D acide
L amine - L acide.

La comparaison des pouvoirs rotatoires de chacune d'entre elles permet d'aboutir aux conclusions suivantes :

1) Les couples L-L et D-D d'une part, L-D et D-L d'autre part, ont, à concentrations égales, des pouvoirs rotatoires symétriques.

2) Dans l'un des cas ces pouvoirs rotatoires correspondent à la somme des pouvoirs rotatoires des énantiomères constituants alors qu'ils en sont tout à fait différents dans l'autre cas. C'est donc qu'il y a association acide - amine en solution dans ce dernier cas. Cette association a lieu, pour l'acide malique entre acide et amine (I ou II) de configuration inverse alors que pour l'acide tartrique elle apparaît entre ions de même configuration.

3) Les valeurs obtenues à partir de solutions contenant amine et acide en proportions différentes permettent de conclure à une association préférentielle de type 1 - 1.

La conclusion présentée au point 2) est particulièrement importante pour la suite du travail puisqu'elle met en évidence l'existence d'une association préférentielle d'un énantiomère d'amine I ou II avec l'un seulement des inverses optiques de l'hydroxyacide et ceci en solution aqueuse diluée c'est-à-dire dans un milieu fortement dissociant.

Séparations sur macromolécule chirale synthétique. (Chapître I).

Plusieurs molécules chirales synthétiques ont été préparées à partir de polystyrènes commerciaux plus ou moins pontés au divinyl benzène (1,1 - 3,8 et 16%) pour lesquels nous avons déterminé les conditions optimales de chlorométhylation et d'amination (Annexe I). La caractérisation classique des résines anioniques ainsi obtenues nous a permis de mettre en évidence deux particularités de comportement : (annexe I)

- d'une part une inversion d'affinité chlorure - nitrate par rapport à l'ordre généralement observé pour ce genre d'échangeur d'ions : on obtient ici $K^{Cl}_{NO_3} > 1$.

- d'autre part une affinité à peu près nulle pour les ions acétate .

Enfin, il apparait que, si le taux de pontage est sans influence sur les résultats obtenus tant qu'il reste faible, une trop forte augmentation de ce taux s'accompagne d'un effondrement de capacité de la résine correspondante. Nous avons donc systématiquement éliminé l'échantillon renfermant 16% de D.V.B. dans la suite de notre étude.

Le comportement des résines ainsi traitées face à chacun des énantiomères des acides maliques et tartriques et à leurs mélanges racémiques a été étudié par deux méthodes d'équilibre :

- potentiométrie
- échanges statiques.

aussi bien en absorption qu'en élution.

Ces 2 méthodes conduisent aux mêmes conclusions :

1 On retrouve, comme lors de l'étude polarimétrique en solution, une association préférentielle entre le motif monomère de configuration donnée (presque toujours D sauf pour quelques essais de confirmation) et l'un des antipodes de l'hydroxyacide . Cette association est encore de type D-L (ou L-D) pour l'acide malique et de type D-D (ou L-L) pour l'acide tartrique .

2 La différence entre les deux inverses optiques se manifeste beaucoup plus nettement lorsque ceux-ci sont mis en contact séparément avec la résine que lorsque ce contact a lieu simultanément sous forme de racémique . La différence de solidité des associations D-L et D-D (ou L-D et L-L) n'apparait plus qu'à l'élution conduisant à des coefficients d'échanges sélectifs qui sont en moyenne

$$K_D^L \sim 3 \text{ pour l'acide malique}$$

$$1 < K_L^D < 2 \quad " \quad " \quad \text{tartrique}$$

A ce stade il est donc possible de prévoir une sépara-

tion stéréosélective en "batch".

3 La cinétique d'échange est très lente, ce que la potentiométrie met particulièrement bien en évidence.

Un essai de séparation par élution sur colonne, réalisé avec l'acide malique racémique et dans des conditions de vitesse d'écoulement moyenne : 12ml.h^{-1} démontre que les séparations, comparées à celles obtenues statiquement, ne progressent pas, l'écoulement se faisant trop loin de l'équilibre. Il faudrait diminuer la vitesse jusqu'à tendre vers un essai statique pour retrouver des résultats positifs mais la méthode n'est alors plus opérationnelle.

Si donc la différence de stabilité des 2 associations D-D et D-L (ou L-L et L-D) est prouvée de manière indiscutable aussi bien par les essais en solution que par les expériences à l'équilibre sur résine asymétrique, il apparait que l'exploitation pratique de ce résultat est limitée par la cinétique très lente des échanges à la seule possibilité d'obtention d'échantillons de bonne pureté optique correspondant à une très faible fraction de la capacité fixée. Ceci est d'ailleurs parfaitement en accord avec les travaux récents de Manecke* portant sur la séparation d'isomères optiques d'acides mandélique ou α aminophénylacétique racémiques à l'aide de diverses résines polystyrène chlorométhylé ou sulfoné puis aminé par différents α aminoacides ou aminés.

* Manecke G. ; Lamer W. Die Ang. Makromol. Chem. 1972, 24,51

Séparation à l'aide de macromolécules biologiques insolubilisées (Chapitre II)

Dans la seconde partie de ce travail, nous nous sommes adressés aux enzymes, macromolécules chirales biologiques qu'il est possible d'insolubiliser sans modifier notablement leurs propriétés ; nous avons essayé d'utiliser à des fins séparatives leur stéréospécificité vis à vis soit d'un substrat soit d'un inhibiteur . Dans les 2 cas, le but à atteindre était de fixer un énantiomère sur l'enzyme sous forme d'un complexe, de stopper la réaction à ce stade puis, si possible de la renverser afin de récupérer le composé fixé.

Nous avons choisi le système glucose oxydase - D glucose comme exemple d'interaction enzyme substrat . L'insolubilisation de la glucose oxydase par réticulation avec de l'albumine avait en effet été étudiée au laboratoire.

Deux types d'essais ont été réalisés :

- dialyse à travers une membrane
- chromatographie sur une colonne de mousse

Ces 2 techniques avaient pour but d'approcher la méthodologie et ont donné de bons résultats sur les points suivants :

1 L'enzyme insolubilisée ne se dégrade pas au cours du temps et est réutilisable plusieurs fois en faisant alterner expérience et régénération.

2 La fixation du D-glucose sur la phase insoluble se fait facilement et, en opérant en milieu anaérobie, la réaction enzymatique est bloquée à ce stade ; il est donc possible de récupérer en solution l'autre sucre -L glucose ou D fructose suivant les essais- pratiquement pur.

La chromatographie sur colonne de mousse est la méthode la plus efficace puisque, si l'on part d'un mélange D glucose-L glucose assez dilué on récupère une solution de

L glucose de 90% de pureté optique en un seul essai, pratiquement à la même dilution que la solution initiale (8.10^{-4} Ml^{-1} au lieu de $10^{-3}Ml^{-1}$).

La technique de dialyse ne permet pas de débarasser la solution de tout le D glucose en une seule étape mais on peut prévoir que ce résultat pourrait être atteint à l'aide d'une succession de membranes identiques en réalisant des montages analogues à ceux utilisés en diffusion gazeuse ; il faudrait dans ce cas particulier prévoir la régénération de la membrane .

Il est par contre impossible d'opérer ensuite le décrochage du D glucose autrement qu'en le transformant en acide gluconique . Ce résultat est en accord aussi bien avec des essais de contrôle effectués sur notre demande par d'autres chercheurs qu'avec la valeur pratiquement nulle trouvée par Slater pour la constante de vitesse de la réaction de dissociation du complexe glucose oxydase-D glucose.

De plus, les méthodes ci-dessus nous ont permis :

- d'atteindre une évaluation minimale du nombre de sites enzymatiques présents, nécessairement supérieur ou égal au nombre de moles de D glucose fixées.
- de comparer les 3 types de diffusion intervenant à travers la même membrane :

diffusion simple, identique pour L glucose et D fructose,

diffusion-absorption du D glucose en absence d'oxygène,

diffusion-réaction du D glucose en milieu aérobie.

- de déterminer l'allure des profils de concentration du D glucose à l'intérieur de la membrane et leur évolution au cours du temps dans le cas de la diffusion-réaction.

Nous avons pour cela appliqué nos résultats expérimentaux aux expressions de S(x) obtenues par Sélégny et Thomas en effectuant un développement en série de Mac Laurin à partir de l'équation

$$\frac{d^2s}{dx^2} = \sigma \frac{s}{1+s}$$

- de montrer que, lors d'expériences successives de diffusion réaction sur une même membrane, il y avait une modification sensible des flux sortants du D glucose mettant en évidence une modification de réactivité des sites enzymatiques avec le nombre de sollicitations. Les flux sortants obtenus à l'aide d'une membrane vierge sont tout à fait en accord avec les résultats expérimentaux de D.Thomas. Par contre, l'accord entre les valeurs de flux obtenues expérimentalement ou calculées à partir des équations ci-dessus est bien meilleur lorsque la membrane a été soumise à plusieurs expériences.

- de déterminer l'allure des isoplanes d'élution simultanées de 2 sucres en présence d'une mousse chargée en glucose oxydase.

Il y a donc là, tout un ensemble de renseignements plus ou moins théoriques concernant la glucose oxydase, dans une voie fort peu explorée par les biochimistes qui se sont plutôt penchés sur l'étude de la cinétique de la réaction enzymatique .

Comme exemple d'interactions enzyme inhibiteur, nous vons choisi le système phosphatase acide-L tartrate, l'inhibition par cet hydroxyacide (et un certain nombre d'autres) s'étant révélée très stéréospécifique lors de recherches effectuées par des biologistes dans un but médical sur des phosphatases acides d'origine animale.

Une étude des conditions d'inhibition par le tartrate de la phosphatase acide de germe de blé dont nous disposions ici a permis de mettre en évidence une inhibition très

nettement préférentielle par le L tartrate, le D tartrate provoquant tout de même une légère inhibition contrairement au cas de la phosphatase acide d'origine prostatique humaine.

En se basant sur le schéma classique du processus d'inhibition on pouvait donc supposer que la constante de formation du complexe enzyme-tartrate responsable de l'inhibition serait beaucoup plus grande dans le cas de l'enantiomère L qui serait retenu préférentiellement sur l'enzyme.

Or, des essais effectués en solution en faisant dialyser une solution de tartrate racémique contre une solution de phosphatase acide contenue dans un tube de dialyse ont mis en évidence une très faible sélectivité inverse de celle attendue : on fixe 1 µ mole de D tartrate excédentaire / 10mg d'enzyme. Ceci prouve que l'ensemble des sites ionisables de la phosphatase acide utilisée, d'ailleurs incomplètement pure, participe à la fixation de tartrate, le résultat de cet ensemble favorisant plutôt la forme D avec la condition évidente que le site lui-même est plus sélectif pour la forme L.

Une membrane montre la perte complète de toute sélectivité, ce qui est dû sans doute à la modification de certaines fonctions ionisables lors de la coréticulation de l'enzyme avec de l'agarose.

Les résultats obtenus ne sont donc pas utilisables du point de vue des séparations, mais nous ont permis :

- de déterminer avec précision les conditions d'inhibition de la phosphatase acide de germe de blé par le tartrate et de tracer un réseau d'abaques d'inhibition de l'hydrolyse du p.nitrophenyl phosphate par le L tartrate pour divers temps de réaction. Nous avons ainsi déterminé quelle était la quantité de L tartrate entrainant une inhibition de 50% ($[L\ tart.] = 5.10^{-1}M$) et démontré que cette valeur était indépendante

du temps de réaction.

- de démontrer que la stéréospécificité d'inhibition n'était pas un critère suffisant pour la prévision de séparation d'énantiomères à propriétés acidobasiques, d'autres sites ionisables de la protéine n'interférant pas avec l'inhibition pouvant intervenir lors de la fixation.

L'ensemble des résultats résumés ici met en évidence que :

- dans le domaine des macromolécules biologiques, il serait intéressant de rechercher d'autres systèmes enzyme-substrat pour lesquels le complexe enzyme-substrat soit moins stable que pour l'exemple étudié ici, mais pour lesquels le bloquage de réaction avant transformation en produit, reste possible ; l'efficacité des séparations deviendrait alors totale puisque les résultats obtenus ici seraient complétés par une récupération du substrat non transformé. Du côté des inhibiteurs, il faudrait envisager l'étude de protéines parfaitement purifiées, de structure bien connue, que l'on pourrait modifier partiellement, par exemple par acylation, sans toucher toutefois au site enzymatique ; ceci représente une ligne de travail qui pourrait être prometteuse mais demande une connaissance très approfondie des méthodes biologiques et est fort longue.

Quant aux molécules synthétiques, l'étude bibliographique (annexe III) des méthodes de séparation montre qu'une prévision rigoureuse du pouvoir séparateur d'une macromolécule chirale face au mélange racémique d'une petite molécule asymétrique ne peut se baser que sur des critères thermodynamiques ou des considérations structurales.

Il serait donc utile de commencer toute recherche en ce sens :

- soit par des déterminations d'énergies d'association intervenant entre la macromolécule et chaque énantiomère.

- soit par une étude de polyélectrolytes optiquement actifs en solution par des méthodes spectrales qui apporterait des renseignements sur le nombre et la nature des liaisons intervenant entre le polyélectrolyte et les 2 énantiomères à séparer.

En conclusion finale, on peut donc dire que si les possibilités de séparations par les méthodes mises en oeuvre ici sont évidentes et ont conduit à des résultats satisfaisants, un seul échec total ayant été enregistré face aux inhibiteurs de macromolécules biologiques, l'approche que nous avons faite était trop empirique pour aboutir à coup sûr à un succès total. Ceci amène à concevoir une étude plus thermodynamique et moléculaire des interactions entre macromolécules et petites molécules toutes deux chirales, qu'elles soient synthétiques ou biologiques, avant de passer aux essais de séparation stéréosélective.

ANNEXE I

PREPARATION DE LA RESINE

ET CARACTERISATION

AI. PREPARATION DE LA RESINE

AI - 1.1. Méthodes générales de préparation de polymères optiquement actifs.

Les divers procédés d'obtention de polymères optiquement actifs qui ont été systématiquement étudiés au cours des quinze dernières années peuvent être regroupés en quatre catégories (Schlutz).

AI - 1.1. 1). Polymérisation ou polycondensation de monomères optiquement actifs. C'est la méthode la plus ancienne et la plus fréquemment utilisée ; on part d'un énantiomère, naturel de préférence, afin d'éliminer l'étape difficile de son obtention, qu'on polymérise par une méthode classique ; du choix, extrêmement important, du catalyseur dépend l'absence de racémisation en cours de réaction. On obtient en général des polymères solubles dans lesquels les C asymétriques sont soit sur la chaîne principale (hétérocycles), soit sur les ramifications (α oléfines, dérivés vinyliques) suivant le mécanisme réactionnel intervenant (Tsuboyama, Suda).

AI - 1.1. 2). Introduction de centres d'asymétrie sur polymères inactifs. Cette méthode permet de fixer des centres asymétriques sur les chaînes latérales de polymères insolubles et est très largement utilisée dans la préparation de polymères optiquement actifs destinés à des essais chromatographiques (Korshak et al., Rogozhin et al.). Elle fait appel à des réactions chimiques classiques qui subissent toutefois quelques modifications par rapport à ce qui a lieu dans le cas des monomères. Les conditions de réaction devront être très strictement délimitées si on veut éviter toute racémisation.

C'est à ce type de préparation que nous avons fait appel pour obtenir notre échangeur d'anions.

AI - 1.1. 3). Polymérisation stéréospécifique de monomères non actifs en présence d'initiateurs optiquement actifs. Cette préparation, au cours de laquelle une réaction de polymérisation est répétée en introduisant une asymétrie au niveau d'un ou plusieurs atomes de carbone avec une configuration bien déterminée, nécessite l'intervention de catalyseurs stéréospécifiques organiques et est assez délicate (Inoue Shokei). Il semble que des catalyseurs à disymétrie d'ensemble comme le quartz ne puissent permettre une telle stéréorégulation (Amariglio).

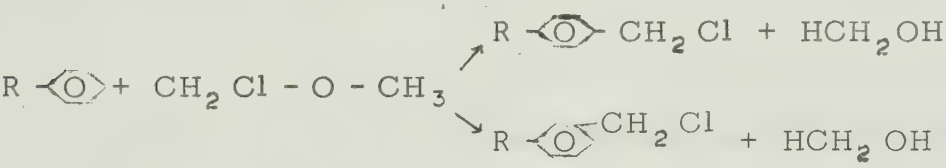
AI - 1.1. 4). Polymérisation asymétrique sélective à partir d'un monomère racémique. Comme la précédente, cette méthode nécessite l'intervention de catalyseurs optiquement actifs (organozinciques). Le monomère de même configuration absolue que le catalyseur polymérise plus rapidement que l'autre. Il est à remarquer que si l'on utilise un catalyseur optiquement inactif, on obtient un mélange racémique des deux polymères actifs, L et D, qui pourront, dans certains cas être séparés ultérieurement. En fait une polymérisation à partir d'un racémique est donc stéréosélective et on obtient un mélange en quantités équivalentes d'un polymère du monomère D et de polymère du monomère L ; l'effet du catalyseur asymétrique sera uniquement cinétique : il augmentera considérablement la vitesse de polymérisation d'un seul des deux monomères.

Parmi ces différentes méthodes la seconde nous a paru la mieux adaptée à notre problème, car elle permet à partir d'une même matrice polymère de greffer différents composés à C asymétrique alors que les autres méthodes nécessitent de refaire une polymérisation différente pour chaque composé, et donc une étude préalable assez longue et délicate pour chaque préparation. Elle permet de plus d'utiliser comme matière première un polymère commercial et élimine donc l'étape de la polymérisation.

Nous avons choisi, comme matrice polymère, des polystyrènes commerciaux plus ou moins pontés au divinyl benzène que nous avons chlorométhylés puis aminés à la D ou L désoxyéphédrine. Des résines de ce type sont couramment utilisés comme échangeurs d'ions commerciaux et, de ce fait, aussi bien la chlorométhylation du polystyrène que l'amination du produit chlorométhylé par la réaction d'Hoffmann ont été largement étudiées. Toutefois l'obtention d'un produit à haute teneur en chlore et non réticulé reste au stade du laboratoire et quelques expériences dans ce domaine se justifiaient. Un polystyrène à chlorométhylation optimale étant obtenu, nous avons ensuite étudié les variables cinétiques de son amination par la désoxyéphédrine après nous être familiarisés avec la réaction d'amination par des amines classiques (diméthylamine et triméthylamine), étape préliminaire que nous ne développerons pas ici.

AI - 1.2. Etude de la chlorométhylation du polystyrène .

Selon la littérature, la chlorométhylation des homopolymères ou copolymères du styrène, ne peut être réalisée que par l'intermédiaire de l'éther chlorométhylique $CH_2Cl - O - CH_3$; il s'agit d'une réaction de substitution sur le noyau aromatique en position méta ou para par rapport à la chaîne polyvinylique :



cette substitution s'effectue en présence d'un catalyseur Friedel et Crafts et peut s'accompagner d'une réaction secondaire conduisant à un pontage additionnel qui, d'après Griffin et Jones se schématise de la manière suivante :

la structure pontée entraîne un gonflement du polymère dans le solvant

sans qu'il y ait dissolution. Cette réaction de pontage est minimisée par dilution dans le chlorométhyléther, ce qui explique que son importance augmente avec la chlorométhylation, c'est à dire avec la consommation d'éther chlorométhylique.

Au fur et à mesure de l'avancement de la réaction il y aura donc une compétition de plus en plus importante pour les noyaux non encore substitués entre chlorométhylation et pontage, l'importance relative de chacune de ces réactions dépendant des conditions opératoires et du polymère de départ. C'est ainsi par exemple que la réaction secondaire est favorisée par l'augmentation de la masse moléculaire du produit de départ ; on aura donc intérêt, si l'on veut approcher la monochlorométhylation totale, à partir d'un polystyrène peu ponté au DVB.

Les différentes méthodes de chlorométhylation du polystyrène décrites se distinguent les unes des autres,

- d'une part par la nature du catalyseur utilisé : chlorure stannique, chlorure d'aluminium et le plus souvent chlorure de zinc ;

- d'autre part parce qu'elles font intervenir soit l'éther chlorométhylique préparé préalablement, soit directement les réactifs de préparation de cet éther (Permutit Co, Trostyanskaya et al.).

Pour chlorométhyler les échantillons de polystyrène dont nous disposions, nous nous sommes appuyés sur les travaux de Griffin-Jones et de Pepper.

Ces auteurs sont en effet les seuls à avoir décrit des méthodes de préparation précises ; l'un et l'autre partent de l'éther chlorométhylique préparé antérieurement qu'ils utilisent à la fois comme solvant du polymère et comme réactif. La différence essentielle entre leurs descriptions réside dans le choix du catalyseur utilisé, $ZnCl_2$ pour Griffin et Jones, $SnCl_4$ pour Pepper.

Nous avons tout d'abord recherché les conditions de réaction optimales sur un échantillon de polystyrène linéaire ; nous avons pour cela, en collaboration avec J.P. Roussillon, étudié successivement l'influence du choix du catalyseur, du solvant, de la dilution, de la température et du temps de réaction sur la pureté et le taux de réticulation du produit obtenu. Précisons en effet que notre but était ici de disposer d'échantillons de polystyrène chlorométhylés suffisamment purs et peu réticulés, et non de mener à bien une étude systématique complète de la chlorométhylation du polystyrène.

AI - 1.2.. 1). Choix du catalyseur. Reprenant successivement les conditions opératoires définies par Pepper et par Griffin et Jones, nous sommes arrivés à la conclusion que le chlorure stannique convenait moins bien que le chlorure de zinc à notre propos. En effet le chlorure de zinc nous a permis d'éviter presque totalement la réticulation et d'obtenir un produit contenant 22,8% de chlore, résultat très proche de la monochlorométhylation totale (pour laquelle la teneur en chlore serait 23,3%) alors que nous n'avons pas pu dépasser 20% de chlore fixé en utilisant le chlorure stannique.

D'autre part, Griffin et Jones, étudiant l'influence de l'addition du catalyseur sur la viscosité du mélange réactionnel, concluent qu'il est préférable d'introduire $ZnCl_2$ en deux fois. Or, aux erreurs de reproductibilité près, nous n'avons constaté aucune différence sur la teneur finale en chlore du polymère préparé avec une ou plusieurs additions (tableau AI. 1).

Introduction $ZnCl_2$	Taux de chlore
en 1 fois à t = 0	22,8%
en 2 fois à t = 0 t = 1h.	22%
en 3 fois à t = 0 t = 1h. t = 2h.	22,3%

Tableau AI. 1.

$ZnCl_2$ nous permettant d'éviter la gélification, nous n'avons pas essayé d'autres catalyseurs tel $Al_2 Cl_6$.

AI - 1.2. 2). Choix du solvant: l'éther chlorométhylique présente l'intérêt de gonfler puis de solubiliser aussi bien le polystyrène de départ que le polymère chlorométhylé ; il est, de plus, bon solvant de $SnCl_4$; quant à $ZnCl_2$, s'il est insoluble dans l'éther pur, il se dissout très bien dans la solution de polystyrène. C'est donc un solvant pleinement satisfaisant du point de vue théorique, mais qui présente pratiquement quelques inconvénients : très volatil et toxique, il s'hydrolyse facilement à l'air en libérant des vapeurs d'acide chlorhydrique. D'autre part il est impossible de récupérer par distillation l'éther en excès employé comme solvant, ce qui devient un facteur onéreux dans la préparation. En effet, lors de la précipitation du polystyrène chlorométhylé par l'alcool méthylique, l'éther réagit avec l'alcool suivant la réaction :

$$HCH_2OH + ClCH_2 - O - CH_3 \rightarrow CH_3 - O - CH_2 - O - CH_3 + HCl$$

et une distillation ultérieure permet de recueillir l'azéotrope méthanol-méthylal.

C'est pourquoi, nous inspirant toujours des expériences de Griffin et Jones, nous avons réalisé quelques essais en utilisant successivement comme solvant le tétrachloréthylène, le dichloroéthane et un solvant pauvre, l'éther de pétrole. Aucun des trois ne s'est révélé efficace : le premier dissout mal le catalyseur et au bout de huit heures le polymère ne contient que 6,3% de chlore ; le second semble former un complexe rouge foncé avec $ZnCl_2$ au bout de 24 heures, sans qu'il y ait dissolution préalable ; quant à l'éther de pétrole, il favorise la réaction secondaire de pontage. Nous avons donc finalement conservé l'éther chlorométhylique qui semble bien être le solvant à retenir malgré les inconvénients signalés, comme des travaux de chercheurs japonais l'ont confirmé (Utsunomiya Yochi et al).

Jones ayant démontré que la réaction de pontage devient plus importante lorsque la concentration du polystyrène augmente, nous nous sommes placés directement dans des conditions de dilution assez grandes qui nous ont donné satisfaction et que nous avons donc conservées par la suite ; elles correspondent à un rapport $\frac{C_{EM}}{C_{PS}} = 18,35$, C_{EM} étant la concentration molaire en éther chlorométhylique et C_{ES} la concentration en motifs styréniques.

Ayant ainsi choisi un catalyseur et un solvant, nous avons adopté pour la suite des essais les proportions suivantes de réactifs : 1,9 g (soit 0,018 M en motifs styréniques) de polystyrène pour 0,7 g de chlorure de zinc (soit 0,0051 mole) et 25 cm^3 d'éther chlorométhylique.

Pour ces concentrations de réactifs, nous avons ensuite étudié l'influence de deux autres facteurs : température et temps, sur l'avancement des réactions principale et secondaire, afin d'optimiser le rendement de la chlorométhylation.

AI - 1.2. 3). Choix de la température : la courbe (AI. 1) qui représente la variation du taux de chlorométhylation avec la température de réaction, tous les autres facteurs (concentrations et temps) étant constants, met en évidence l'influence favorable d'une légère augmentation de température, ce qui confirme les travaux de Mendeleva. Dès 30°C, le taux de chlorométhylation est voisin de 1 alors qu'il n'y a encore aucune gélification, ce qui n'est plus vrai ensuite ; c'est donc à cette température que nous avons choisi de travailler.

AI - 1.2. 4). Choix de la durée de réaction : on prépare une solution de polystyrène dans l'éther chlorométhylique puis on y ajoute le catalyseur, l'instant de cette addition étant pris comme origine des temps. La température est maintenue à 30°C pendant toute

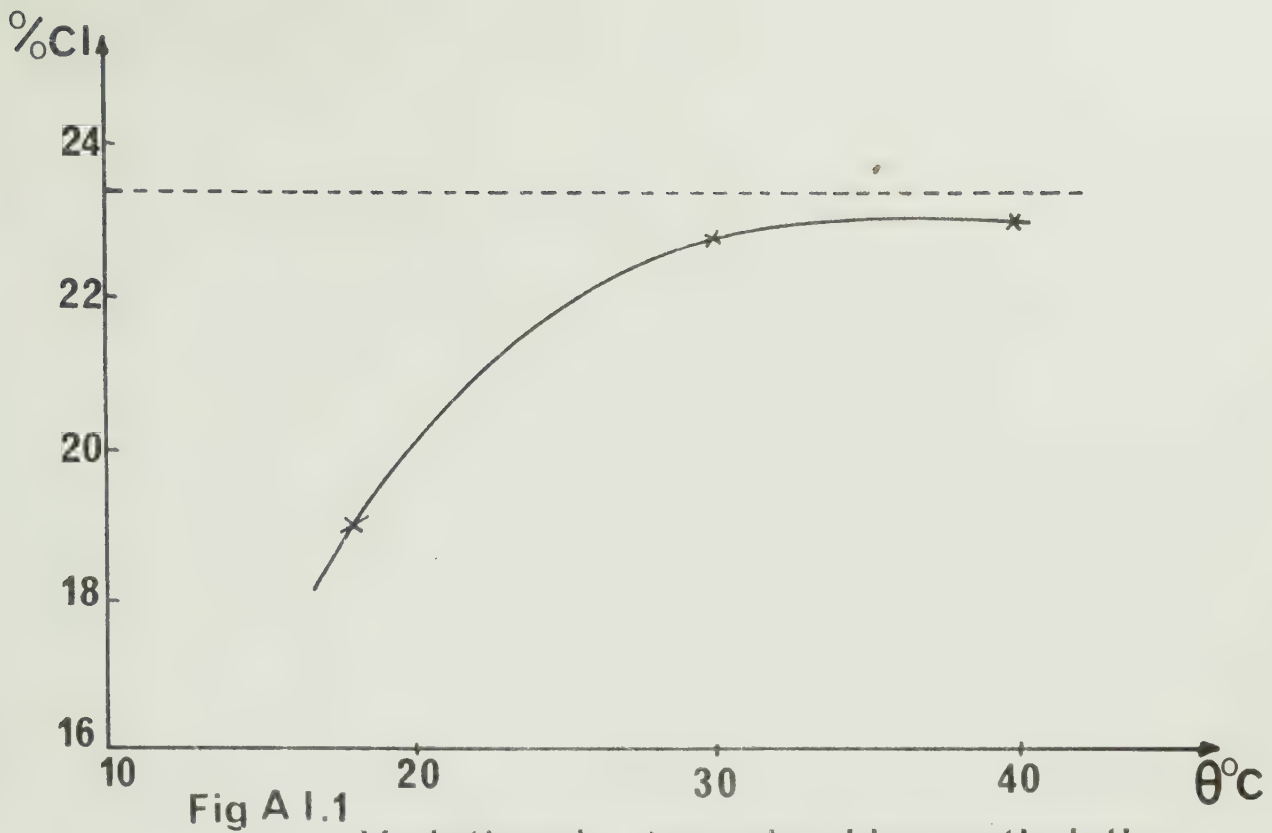


Fig A I.1 Variation du taux de chloromethylation avec la température de réaction

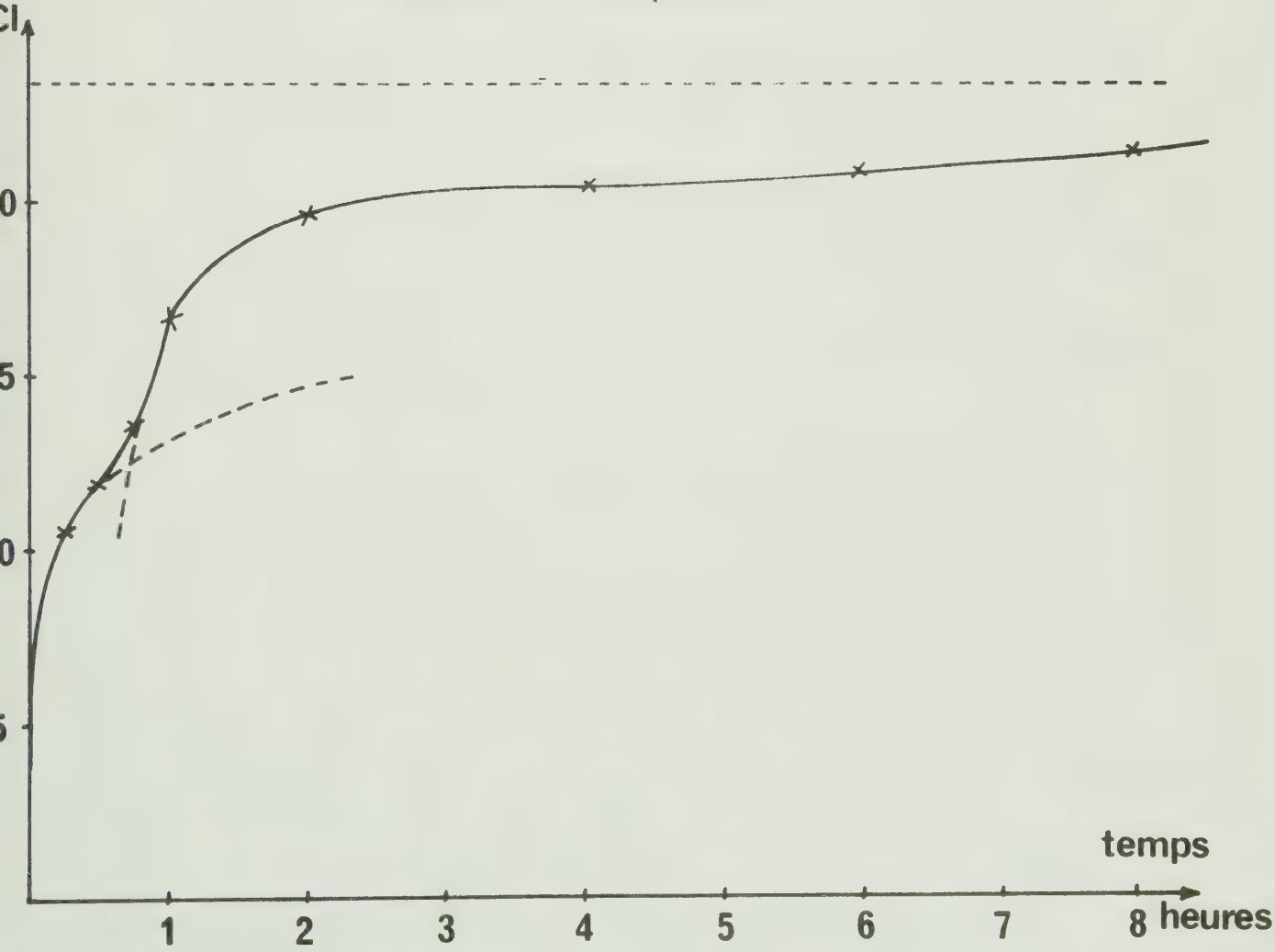


Fig A I.2 Variation du taux de chloromethylation avec le temps de réaction

la durée de l'expérience et l'on effectue des prélèvements d'où l'on précipite le polymère par addition de méthanol. La teneur en chlore est déterminée pour chaque échantillon ainsi obtenu, ce qui permet de tracer la courbe (AI. 2) : taux de chlore (%) = f (t).

L'examen de cette courbe montre que la chlorométhylation, très rapide au début tend asymptotiquement vers une valeur constante (23,3% Cl) ; on note une particularité de la courbe entre 15 et 50 minutes, comportement déjà mentionné par Griffin et Jones lors de mesures de viscosité. Il est possible qu'au cours de la chlorométhylation, le polymère subisse des modifications de solubilité qui influent sur la cinétique de la réaction ; or, en 15 minutes, la moitié des noyaux styréniques sont chlorométhylés, ce qui peut expliquer l'inflexion qui apparaît au cours de la première heure de réaction.

Au bout de 8 heures, l'évolution de la réaction devient très faible, aussi avons nous choisi ce temps pour nos préparations.

AI - 1.2. 5). Conditions expérimentales de préparation : l'étude systématique de l'influence des différents facteurs, concentrations, temps et température sur l'avancement de la réaction, nous a finalement conduits à adopter le mode opératoire suivant pour la préparation de polystyrène chlorométhylé non ponté :

19 g de polystyrène sont introduits dans 250 cm^3 d'éther chlorométhylique sous agitation à 30°C. Après gonflement et dissolution complète du polymère, obtenue en 30 minutes environ, on ajoute 7 g de chlorure de zinc ; la solution devient immédiatement jaune-orangée et cette coloration évoluera dans le temps vers un rouge plus ou moins intense. L'agitation et la température sont maintenues constantes pendant 8 heures ; aucun gel n'est alors apparu et la réaction est stoppée par 5 à 6 cm^3 de dioxanne.

Le polymère chlorométhylé est précipité lentement, par petites quantités, dans 400 à 500 cm^3 de méthanol anhydre, de

manière à obtenir un produit suffisamment divisé qu'on lave 8 à 10 heures à l'alcool méthylique ; il est ensuite déchiqueté et séché sous vide à température ordinaire ; on peut alors observer un gonflement considérable du polystyrène imprégné de solvant, ce qui donne un produit facile à pulvériser après 24 heures environ.

L'éther chlorométhylique et le chlorure de zinc imprégnant le produit brut sont l'un et l'autre très solubles dans le méthanol ; ils seront donc facilement éliminés par lavages successifs par ce solvant. Des essais comparatifs de purification du polymère, soit par lavages soit par précipitations successives, ont montré que de simples lavages étaient aussi efficaces et que, de plus, le rendement (82%) était amélioré par rapport aux précipitations (71%). En fait deux lavages suffisent pour éliminer toute trace d'éther et de chlorure de zinc.

On obtient finalement 23 g de polystyrène chlorométhylé.

Le rendement de l'opération est :

$$R = \frac{m_2}{M_2} \times \frac{M_1}{m_1} \times 100$$

où m_1 est la masse de polystyrène utilisé,

M_1 est la masse du motif styrénique

m_2 est la masse de produit obtenu

M_2 est la masse du motif styrénique chlorométhylé

soit : $R = \frac{23}{152,5} \times \frac{104}{19} \times 100 = 82,5\%$

Dans le cas de la chlorométhylation de billes de copolymère styrène - divinylbenzène (3,5%) (Afcolène-Péchiney) la réaction évolue de manière semblable à celle décrite pour le polymère linéaire après qu'on ait apporté au mode opératoire les modifications suivantes :

Le pontage dû au DVB diminue la réactivité du

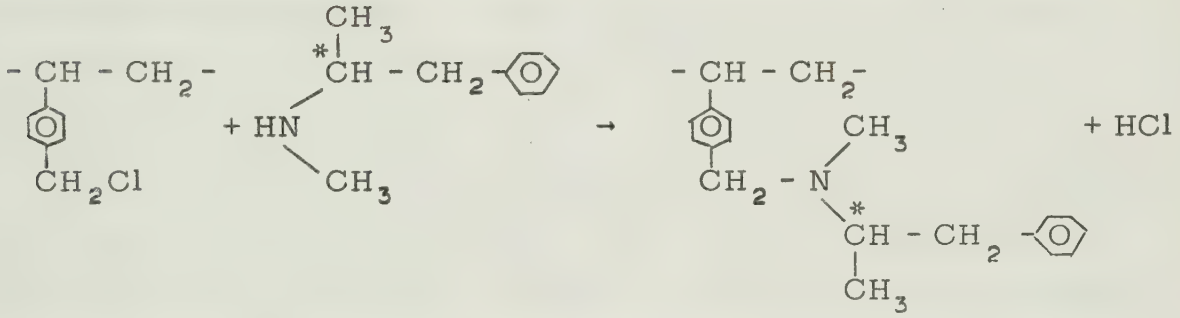
polystyrène et le chlorure de zinc n'est plus un catalyseur suffisamment puissant. Il convient alors de le remplacer par du chlorure stannique ;

- il est préférable d'effectuer la réaction en opérant sous reflux suivant la technique de Pepper.

AI - 1.3. Amination du polystyrène chlorométhylé.

Dans le but de préparer une résine optiquement active il nous fallait fixer l'un des énantiomères d'une amine asymétrique sur le polymère chlorométhylé.

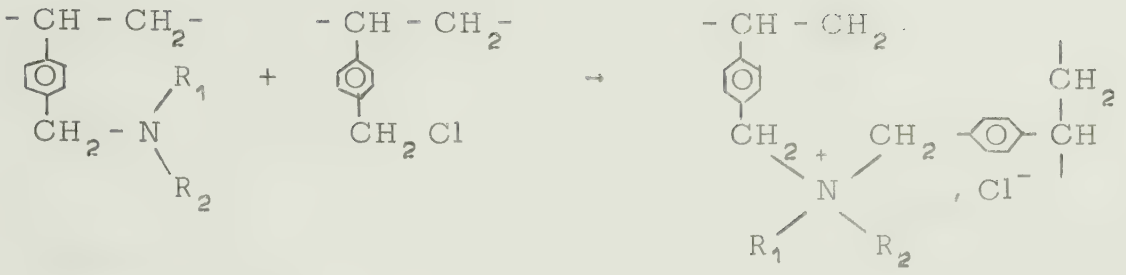
Nous avons choisi la Nα diméthyl phényl éthyl amine ou désoxyéphédrine : $CH_3 - NH - \overset{*}{C}H(CH_3) - CH_2 - C_6H_5$, amine secondaire susceptible de réagir avec le polymère suivant la réaction :



on obtient donc un polymère à fonction amine tertiaire comportant un C asymétrique en α de cette fonction ; la présence de deux noyaux aromatiques en β par rapport à l'atome d'azote va conférer à l'amine des propriétés ioniques particulières.

Suivant les conditions de pH du milieu, on obtient soit l'amine sous forme base libre, soit le chlorhydrate d'amine.

Il est nécessaire de préciser les conditions expérimentales qui permettent de réaliser une amination aussi complète que possible tout en évitant la racémisation de l'énantiomère choisi ainsi qu'une réaction secondaire de pontage additionnel de type :



qui conduit à une gélification.

Nous allons donc voir successivement les préparations et caractéristiques de l'amine puis l'étude de l'amination du polystyrène chlorométhylé linéaire et, enfin, la préparation de quelques résines.

AI - 1.3. 1). Préparation et caractéristiques de l'amine. Pour quelques essais nous avons pu utiliser la L (+) désoxyéphédrine Eastman Kodak mais, dans la majorité des cas, nous avons effectué la résolution du racémique par cristallisation fractionnée des D tartrates diastéréoisomères selon la méthode d'Ogata ; nous nous sommes inspirés de la technique de Ming Chen Chiang et Pangli mais avec une variante : nous avons opéré en milieu aqueux de préférence au milieu alcoolique. Des quantités équimoléculaires d'amine racémique et d'acide D tartrique sont dissoutes dans le minimum d'eau. Le D tartrate de D amine cristallise en premier et la purification est totale après deux recristallisations successives. Le point de fusion du produit cristallisé est 161-162°, le rendement est de 30 à 35% par rapport à l'amine de départ. Après évaporation complète des eaux mères, on recueille le sel de l'amine L (+).

On libère l'amine par alcalinisation à la soude puis extraction à l'éther suivie d'une distillation.

La désoxyéphédrine se présente sous forme d'un liquide incolore, peu mobile, à odeur caractéristique. Elle est soluble dans de nombreux solvants organiques. Son point d'ébullition est de 80°C sous P = 4 mm Hg et de 210°C sous P = 1 atmosphère.

La tendance à la racémisation est faible : le pouvoir rotatoire n'est affecté ni par une ébullition à reflux de 48 heures ni par des distillations sous vide répétées.

AI - 1.3. 2). Addition sur polystyrène linéaire chlorométhylé : il suffit de faire diffuser l'amine dans le polymère, préalablement gonflé dans du benzène sec, sous atmosphère d'azote. Suivant les conditions expérimentales, des traces de produit insoluble puis une gélification totale apparaîssent au bout d'un temps plus ou moins long. Le polymère solide obtenu est purifié par lavages à l'éthanol puis au méthanol, ce qui solubilise la désoxyéphédrine n'ayant pas réagi. Séchée sous vide à température ordinaire, la résine obtenue sous forme chlorhydratée est une poudre blanche. Nous avons, comme pour la chlorométhylation, étudié l'influence de divers facteurs sur l'avancement de la réaction.

AI - 1.3. 2.1). Influence de la température : trois essais effectués dans des conditions de concentration (1 g polymère/10cm^3 de benzène) et de temps (4 jours) identiques montrent que l'élévation de température favorise l'amination, laquelle est loin d'être négligeable dès 0°C (tableau AI. 2)

	t°C	0	30	50
	N%	3,2	3,45	5,0
rendement	(1)	69%	74%	108%
	(2)	61%	65%	95%

(1) produit obtenu : chlorhydrate d'amine
(2) produit obtenu : amine sous forme base libre

Tableau AI . 2

La valeur du taux d'azote obtenue à t = 50°C, supérieure à la valeur calculée théoriquement pour le chlorhydrate d'amine (N% = 4,64%) montre que la résine préparée n'est pas entièrement sous forme sel, un certain nombre (au moins 50%) de groupements aminés sont sûrement sous forme base libre. Remarquons que les résultats présentés ci-dessus sont des moyennes établies sur trois expériences identiques.

AI - 1.3. 2.2). Influence de la concentration du polymère. Divers essais effectués à température ambiante pendant 4 jours à partir de 1 g de polystyrène chlorométhylé mis en présence de quantités variables de benzène permettent d'établir que le taux d'azote est maximal pour une amination en phase géléifiée unique (figure AI. 3). Pour des quantités de benzène inférieures à 4 cm^3 (concentration en polystyrène 0,25 g/cm^3) on constate qu'une couche d'amine de 2 g est entièrement absorbée par le polymère alors que, pour des volumes de benzène plus importants, une phase liquide subsiste au bout de 4 jours et on constate en déterminant la teneur en azote que le degré d'amination décroît linéairement lorsque le volume du solvant augmente.

AI - 1.3. 2.3). Influence du temps de réaction : étudiée pour diverses températures et différentes concentrations du polymère, cette influence est résumée par le graphique (AI. 4). On voit que, pour un ensemble donné concentration/température, le degré d'amination augmente avec le temps de réaction jusqu'à une valeur limite pratiquement atteinte au bout de 4 jours dans tous les cas.

AI - 1.3. 2.4). Conditions expérimentales d'amination : des résultats précédents, on peut déduire que le mode opératoire conduisant à une amination optimale du polymère de départ est le suivant :

1 g de polystyrène est mis en présence de 4 cm^3 de

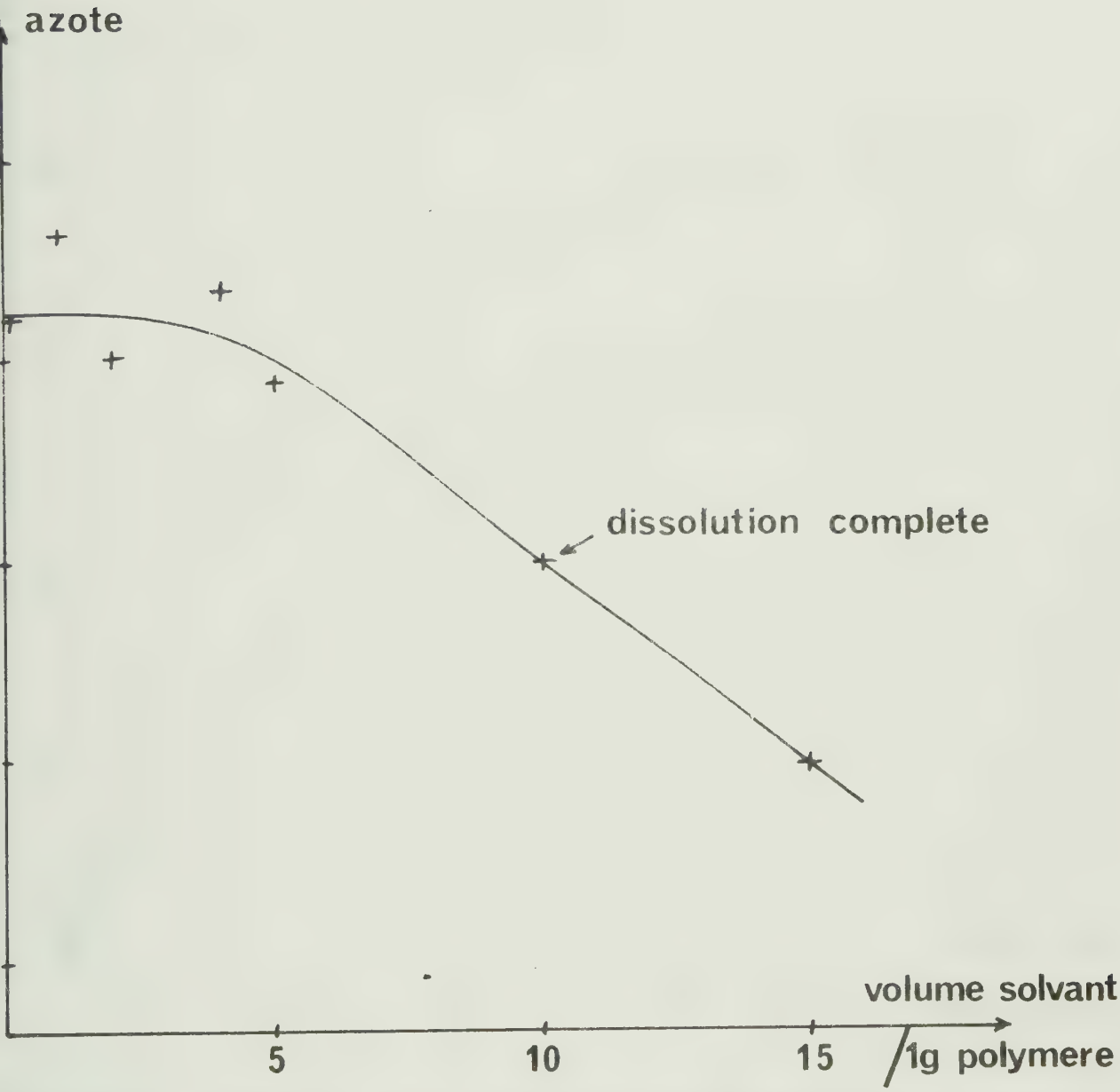


Fig A I.3 variation du taux d'amination avec la dilution du polymère

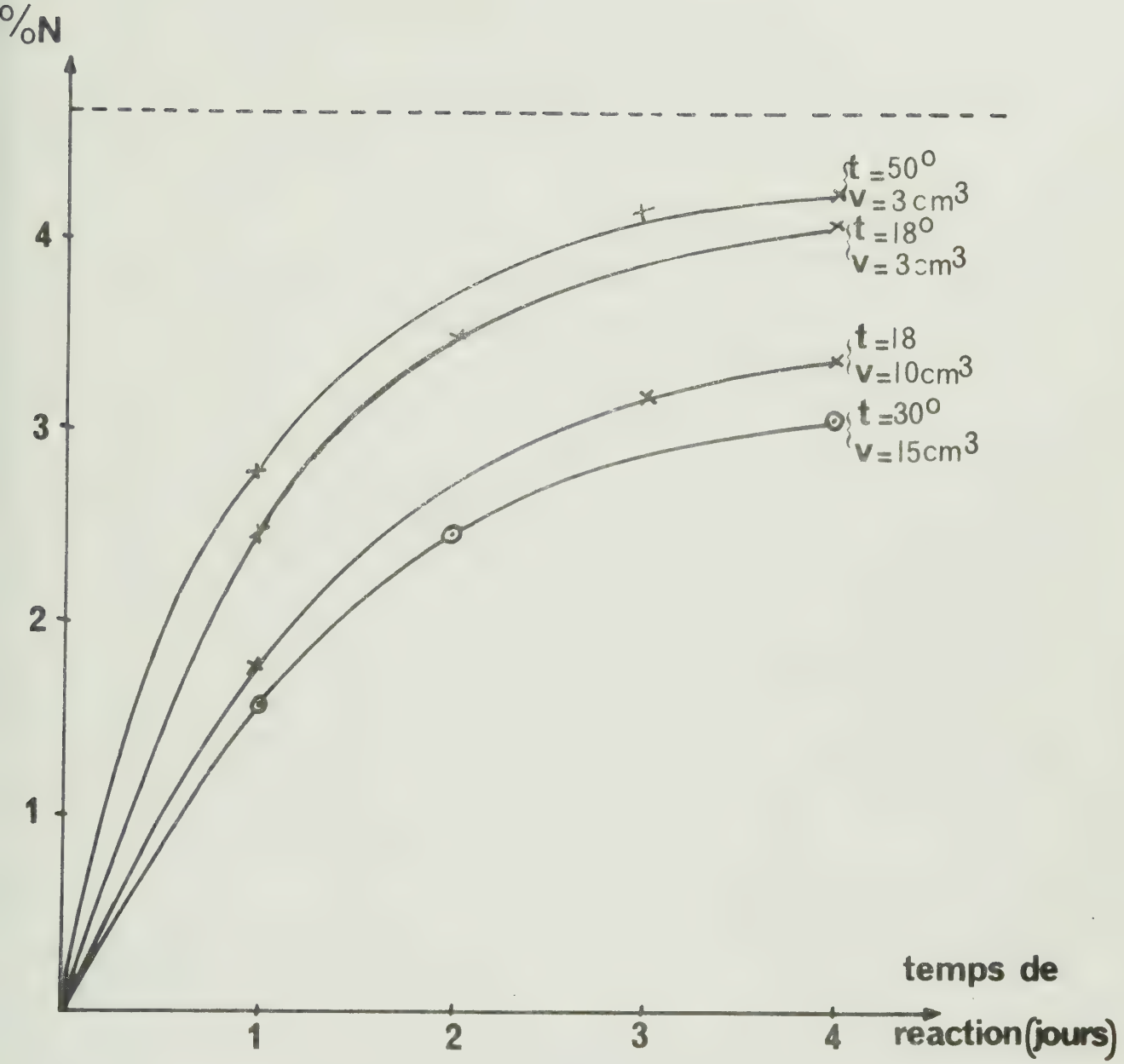


Fig A I.4 variation du taux d'amination avec le temps de réaction

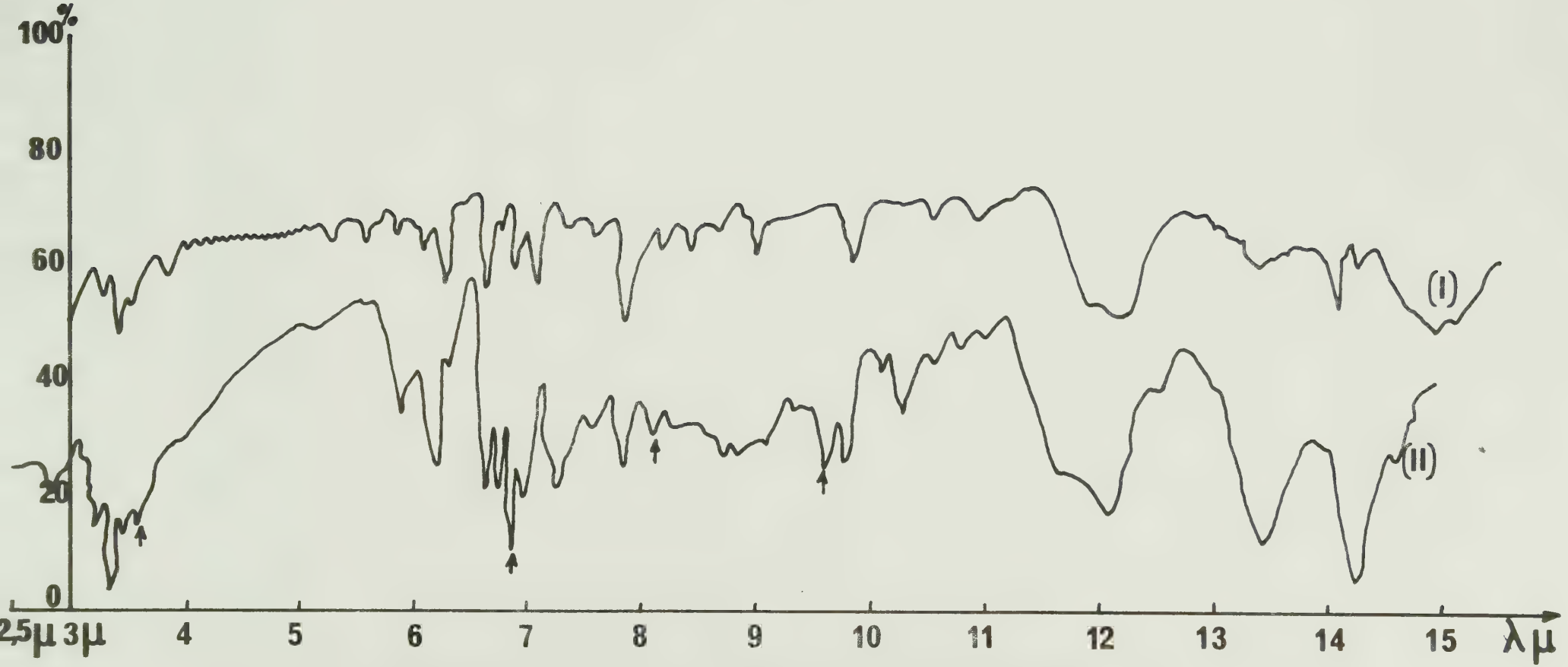
benzène ; après obtention d'une phase gélifiée unique, on ajoute l'amine et on laisse diffuser 4 jours à 50°C sous atmosphère d'azote. La couche d'amine est alors totalement absorbée. Le polymère obtenu est purifié par lavages à l'éthanol puis au méthanol et séché sous vide à température ambiante.

Nous avons ainsi préparé deux résines à partir de polystyrènes pontés l'un par 1,1% de divinylbenzène, l'autre par 3,8% de divinylbenzène. Les quantités d'amine fixées (correspondant à des taux d'azote de 3,87% et 3,88% respectivement) sont identiques bien que l'indice de réseau soit différent dans les deux cas. Si l'on calcule le taux d'azote correspondant à l'amination totale par la désoxyéphédrine d'un polystyrène linéaire p. chlorométhylé à 80% (ce qui correspond aux résultats expérimentaux) on trouve une valeur de 4,27%, l'amine étant sous forme chlorhydrate. Or nous n'avons jamais atteint cette valeur expérimentalement, ce qui peut s'expliquer par une difficulté d'approche des noyaux chlorométhylés par une molécule volumineuse telle que la désoxyéphédrine ; cette accessibilité réduite est une conséquence de la réticulation par le DVB ; on peut évaluer à 4% le nombre des noyaux chlorométhylés concernés par ce phénomène.

Donc au total la résine optiquement active renfermera un carbone asymétrique sur environ 75% des noyaux aromatiques présents dans la chaîne polystyrénique.

Nous nous sommes assurés de la structure des produits obtenus en faisant sur chaque échantillon un spectre I.R. en phase solide dans KBr (sur Beckmann I.R.7). La figure AI. 5 donne à titre comparatif les spectres d'une résine chlorométhylée et du même produit après amination. Sur ces spectres nous avons pu identifier un certain nombre de raies dont certaines sont communes aux deux composés telles les bandes caractéristiques du noyau benzénique.

La raie 1270 cm^{-1} (7,8 μ) caractéristique des noyaux chlorométhylés se retrouve sur les deux spectres ce qui prouve bien



Spectre I R du polystyrène chloromethylé (I)

,, ,, ,, aminé (II)

qu'un certain nombre d'entre eux n'ont pas réagi avec l'amine. Par contre l'absence de pic à 2600 cm^{-1} (3,8 μ) montre que le polymère qui avait subi un traitement à la potasse, est sous forme amine basique.

Nous avons en outre pu identifier les raies suivantes :

(1). 2920 cm^{-1} (3,4 μ) $CH_2 - N - R_2$ et $C - CH_3$

(2). 2840 " (3,5 μ) $- CH_2 -$

(3). 2790 " (3,6 μ) $N - CH_3$ et $R_1 - CH_2 - N - R_2$

(4). 1455 " (6,9 μ) $R - CH_2 - N - R_2$; $C - CH_3$ et CH_2Cl

(5). 1215 " (8,2 μ) $C - N$ et CH_2Cl

(6). 1020 " (9,8 μ) $C - N$

les raies (3), (4) et (6) étant spécifiques de liaisons C-N, donc présentes seulement sur le spectre du polystyrène aminé.

Les résines préparées étant destinées à fonctionner comme échangeurs d'ions il est nécessaire, afin d'accélérer les échanges, de les conditionner en les traitant alternativement par un acide fort et une base forte (soit HCl 2N et NaOH 2N) ; après 3 ou 4 cycles du même type, la résine est lavée à l'eau afin d'éliminer la base forte (ou l'acide suivant les cas) adsorbée, puis à l'alcool.

Il s'est alors produit au niveau de l'amine une série d'échanges :

$$-\overset{+}{N}H,\ Cl^- + OH^-_{sol.} \rightleftarrows -N + Cl^-_{sol.} + H_2O$$

et suivant le type du dernier contact acido-basique, on se trouve en présence soit d'une résine entièrement sous forme base libre (dernier lavage par NaOH) soit d'une résine entièrement sous forme acide (dernier lavage par HCl).

AI. 2. PROPRIETES D'ECHANGEUR D'IONS DE LA RESINE OBTENUE VIS A VIS D'ANIONS OPTIQUEMENT INACTIFS

Afin de comparer de manière valable les résultats concernant la stéréospécificité éventuelle des divers échangeurs préparés, il est indispensable d'en effectuer une caractérisation préalable.

On peut tout d'abord, à partir de la teneur en azote, définir la capacité théorique de la résine, c'est à dire le nombre de milliéquivalents de fonctions aminées, présent dans 1 g de polymère sec soit :

$$C_{th\ meq/g} = \frac{N\%}{14} \times 10 \qquad (1)$$

La valeur théorique ainsi définie représente un maximum de capacité qui peut ne pas être atteint par suite soit d'un temps de réaction très long, soit d'une accessibilité aux sites échangeurs rendue difficile par le pontage, soit enfin d'une hydrolyse. C'est pourquoi il est nécessaire de déterminer expérimentalement la capacité réélle de la résine ($C_{exp} \leq C_{th}$), ce qui nous a conduit à des valeurs très proches de C_{th} dans le cas d'échanges chlorure-nitrate ou chlorure-hydroxyle. Aussi nous refèrerons-nous toujours à la capacité théorique dans la suite de ce travail.

Il était d'autre part intéressant de préciser le comportement du type d'échangeur expérimenté ici, vis à vis d'ions classiques, afin de pouvoir le comparer à des résines commerciales. Pour caractériser une résine donnée on peut, après avoir calculé sa capacité théorique :

1). Définir expérimentalement les coefficients apparents d'échange sélectif d'un ion par rapport à un autre, ce qui permettra d'établir une classification d'affinité pour les différents ions étudiés.

2). Tracer les courbes de neutralisation directe et en retour de la résine basique par les acides correspondant aux anions précédents.

Ces deux moyens de caractérisation conduisent évidemment aux mêmes conclusions et la double caractérisation permet de confirmer les résultats obtenus.

AI - 2.1. Méthode d'étude et appareillage. Nous avons choisi comme méthode d'étude de la résine la "potentiométrie en continu" employée par E. Sélégny ( ), qui consiste à mesurer le pH d'une suspension de polymère dans une solution aqueuse d'électrolyte et qui présente l'avantage de ne pas nécessiter de séparation de phases pour chaque mesure.

Les essais sont effectués dans des batteries d'ampoules à échange d'ions (figure AI. 6), appareil utilisé par Moralli et modifié par E. Sélégny qui comporte à sa partie supérieure un rodage suffisamment large pour permettre le passage des électrodes et, à sa partie inférieure une plaque de verre fritté qui permet d'éliminer une solution et de la remplacer par une autre sans risque de modification du poids de l'échantillon posé une fois pour toutes. Ces ampoules permettent aussi, en travaillant toujours sur la même prise d'essai, d'éprouver la résistance de la résine à travers les cycles d'échange.

Nous avons disposé, pour notre expérimentation de polystyrènes, de provenance et caractéristiques diverses, que nous avons traités selon les méthodes de chlorométhylation et amination mises au point au laboratoire et exposées précédemment. Nous avons travaillé :

AMPOULE A ECHANGE D'IONS

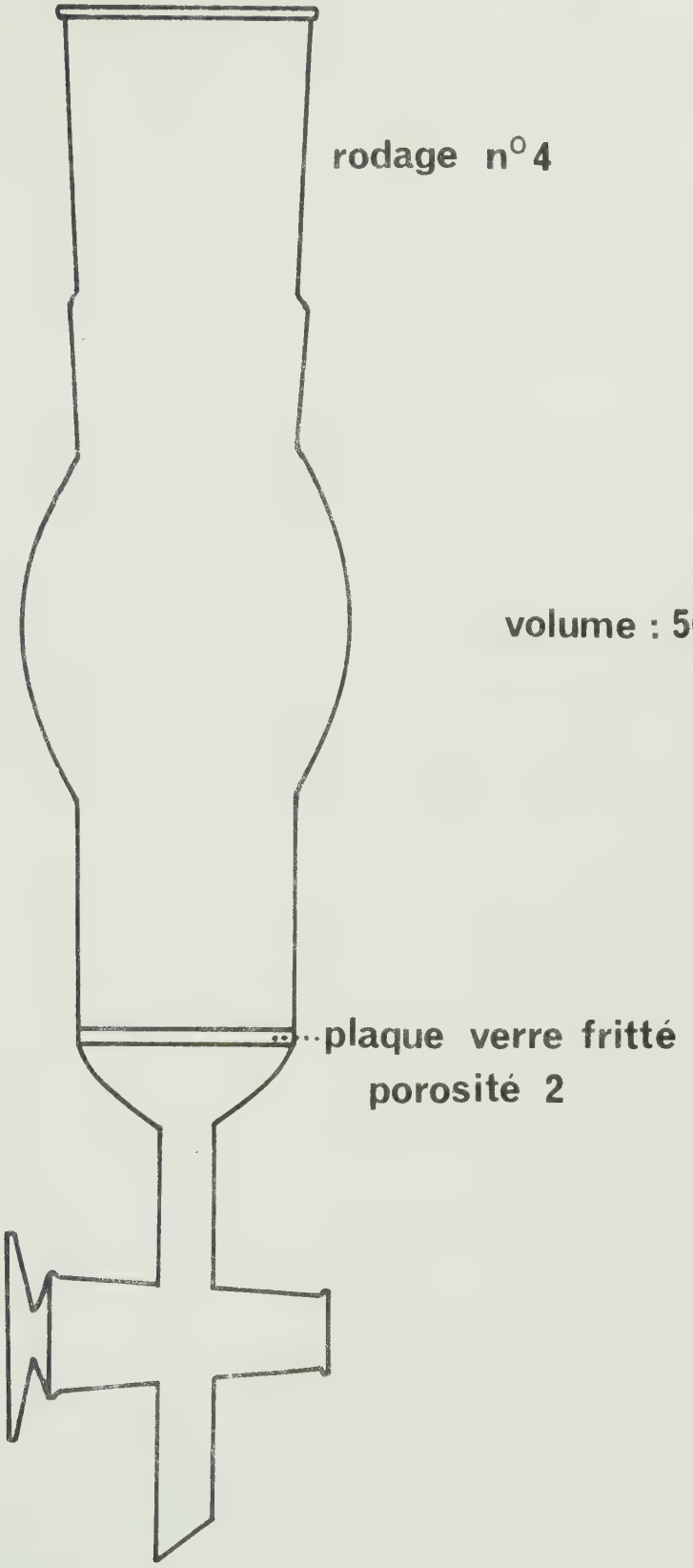


Fig A I.6

1). Sur un polystyrène très peu ponté et déjà chlorométhylé, de provenance américaine, sur lequel nous avons réalisé la plus grande partie de nos expériences après amination à la D (-) désoxyéphédrine soit PSD cet échantillon.

2). Sur deux polystyrènes commerciaux pontés par 1,1% et 3,8% de divinylbenzène ; ces polymères ont été chlorométhylés et aminés soit à la D (-) soit à la L (+) désoxyéphédrine pour donner les échangeurs PS 1,1D ; PS 1,1L ; PS 3,8D et PS 3,8L.

3). Sur un copolymère styrène-divinylbenzène, très ponté par suite d'une haute teneur en DVB (16%), préparé par la société Diaprosym.

La chlorométhylation se fait facilement et permet d'atteindre un taux proche de la monochlorométhylation théorique sauf dans le cas du dernier polymère ou le dosage de chlore (Cl% = 13,5) correspond à la chlorométhylation de 57% seulement des noyaux styréniques.

Dans tous les cas la teneur en azote correspond à une amination de 95% des noyaux chlorométhylés. Les capacités théoriques qu'on peut en déduire sont regroupées dans le tableau suivant :

Nature de l'échantillon	N%	C_{th} meq/g
PS D	4,95	3,5
PS 1,1 D	4	2,85
PS 1,1 L	3,7	2,7
PS 3,8 D	4	2,85
PS 3,8 L	4,1	2,9
PS 16 D	3,20	2,3
PS 16 L	3,10	2,2

Tableau AI. 3

On remarque que le pontage au DVB diminue la capacité de la résine, ce qui est normal puisqu'il diminue l'accessibilité aux sites actifs.

Nous développerons l'étude des coefficients d'échange sélectif uniquement dans le cas de la première résine, les conclusions que l'on peut tirer des essais successifs étant identiques dans tous les cas.

AI - 2.2. Détermination des coefficients d'échange sélectif de 2 ions A et B . Ce coefficient est défini par la formule :

$$K_B^A = \left[\frac{(A)}{(B)}\right]_{res.} \times \left[\frac{(B)}{(A)}\right]_{sol.}$$

qui n'est autre que l'expression de la loi d'action de masse appliquée à l'équilibre :

$$Res.\ NH^+B^- + A^-_{sol} \rightleftarrows Res.\ NH^+A^- + B^-_{sol.}$$

en confondant activité et concentration.

Si $K_B^A > 1$, la résine a une affinité plus grande pour l'ion A que pour l'ion B.

Nous avons effectué la détermination expérimentale de K_B^A pour 4 anions : chlorure, nitrate, hydroxyle et acétate.

Nous savons en effet que la méthode de préparation utilisée conduit à un échangeur chlorhydraté ; il est donc intéressant d'étudier le comportement de cette forme, son aptitude à échanger l'ion chlorure avec d'autres anions et en particulier à passer sous forme basique. D'autre part le comportement en milieu acétate est intéressant en raison du pouvoir tampon du système acide acétique/acétate que nous avons utilisé pour fixer le pH des solutions lors des essais de séparation d'énantiomères.

Notons que, comme dans l'équilibre ci-dessus, nous symboliserons la résine sous une forme anionique X quelconque par

Res. NH^+X^-.

AI - 2.2. 1). Echanges chlorure-nitrate. 1 meq. de PSD pris sous forme chlorure et mis en présence d'une solution $\frac{N}{10}$ de nitrate de potassium en excès (5 meq.) dans une ampoule à échange d'ions ; l'ensemble est maintenu sous agitation jusqu'à équilibre, c'est à dire jusqu'à ce que la composition de la solution n'évolue plus. Celle-ci est alors éluée et dosée et est remplacée par de nouveau 5 meq. de KNO_3 $\frac{N}{10}$. Trois opérations identiques effectuées successivement conduisent aux résultats suivants :

Solution		Résine			
$(Cl^-)_{meq.}$	$(NO_3^-)_{meq.}$	$(Cl^-)_{meq.}$	$(NO_3^-)_{meq.}$	$K^{Cl}_{NO_3}$	$\log K^{Cl}_{NO_3}$
0,8	4,2	0,2	0,8	1,29	0,110
$0,17_5$	$4,82_5$	$0,02_5$	$0,97_5$	1,13	0,053
0,02	4,98	$0,00_5$	1	1,23	0,09

Tableau AI. 4

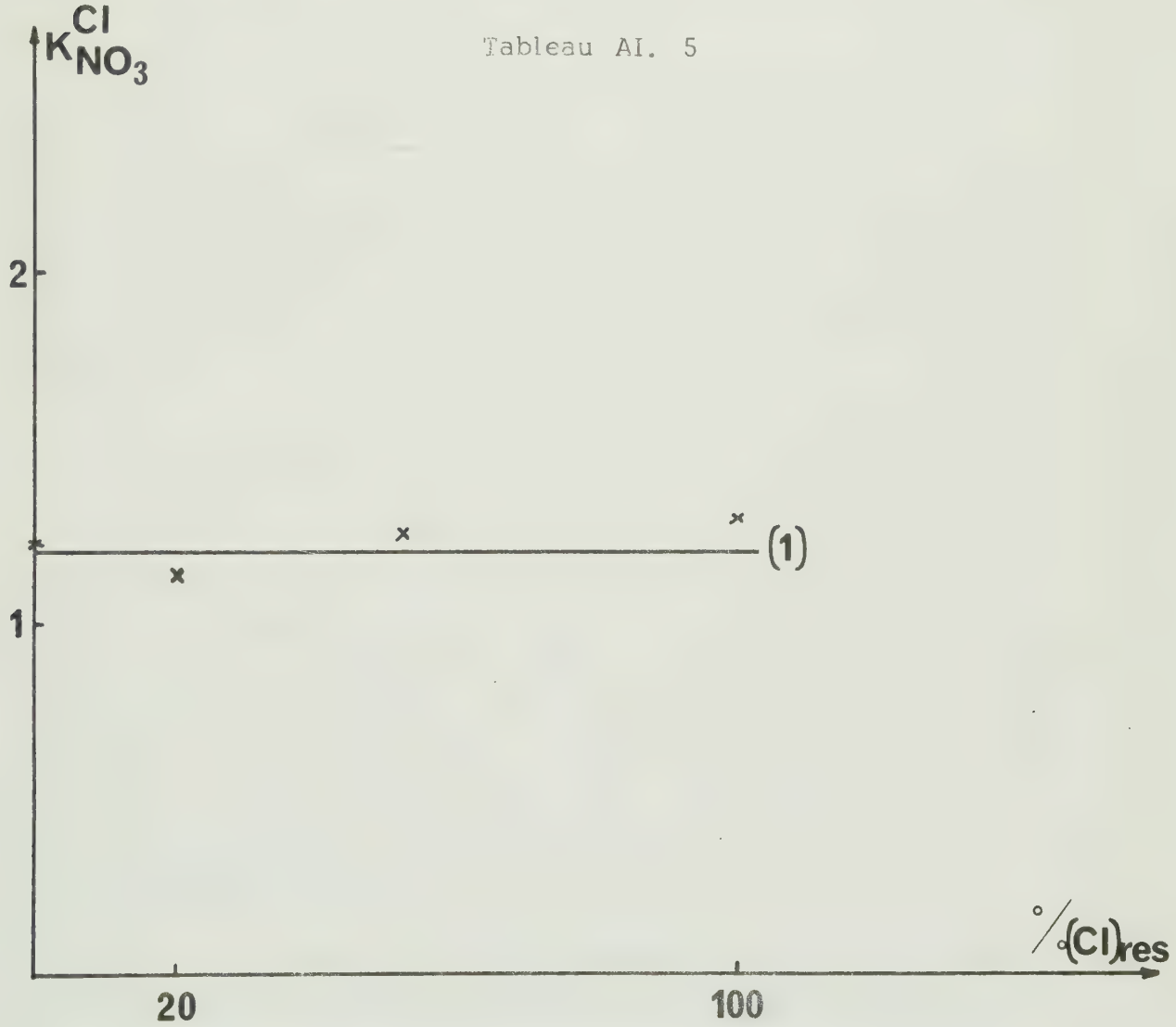
il y a donc échange :

$$\text{Res. } NH^+Cl^- + NO_3^- \rightleftarrows \text{Res. } NH^+ NO_3^- + Cl^-$$

et la valeur de $K^{Cl}_{NO_3}$ nettement supérieure à 1 dans tous les cas met en évidence la grande affinité de la résine pour l'ion chlorure, supérieure même à celle pour l'anion NO_3^- . C'est là un caractère remarquable car contraire à l'ordre d'affinité très généralement observé pour des résines polystyrène amine (Trémillon). Les valeurs obtenues pour K montrent que la composition ionique de la résine de départ n'influence absolument pas la constante d'échange, la valeur moyenne étant $K^{Cl}_{NO_3} = 1,2$ (figure AI. 7). Enfin on remarque expérimentalement que l'échange chlorure-nitrate s'accompagne dans tous les cas d'un gonflement très

Solution		Résine		
Cl^-_{meq}	NO_3^- meq	Cl^-_{meq}	NO_3^- meq	$K^{Cl}_{NO_3}$
0,77	4,23	0,23	0,77	1,61
0,1	4,9	0,13	0,87	7,78
0,02	4,8	0,11	0,89	35

Tableau AI. 5



Influence de la composition ionique de la résine de départ sur $K^{Cl}_{NO_3}$

Fig AI.7

important de la résine qui devient moins dense que la solution d'électrolyte $\frac{N}{10}$; il y a formation de "popcorn polymers".

Différents essais identiques effectués de temps à autre, la résine ayant subi de très nombreux cycles d'échange avec différents anions entre deux déterminations $K^{Cl}_{NO_3}$, aboutissent tous au même résultat.

Si l'on augmente la concentration initiale de la solution de KNO_3 tout en conservant un rapport :

$$\frac{meq_{KNO_3}}{meq_{résine}} = 5,$$

on remarque que la valeur de $K^{Cl}_{NO_3}$ augmente très nettement comme le montrent les résultats du tableau (AI. 5) correspondant à trois échanges successifs, chlorure, nitrate, la solution étant $\frac{N}{2}$ en électrolyte.

On voit que K augmente lorsque la teneur en chlore de la résine de départ diminue, contrairement au cas précédent. Mais il faut remarquer que, dans l'évaluation des quantités de chlorure et nitrate présentes dans la résine et obtenues par le calcul à partir de mesures expérimentales sur la solution, il n'a pas été tenu compte de l'effet Donnan. Or si une telle approximation est légitime dans le cas d'une solution décinormale, elle le devient de moins en moins lorsque la concentration de l'électrolyte en solution augmente ; l'augmentation apparente de $K^{Cl}_{NO_3}$ peut donc être due à une adsorption d'électrolyte par effet Donnan.

Les expériences réalisées avec les autres résines PS 1,1 D et L et PS 3,8 D et L conduisent à des résultats tout à fait comparables à ceux obtenus avec le PSD (tableau AI. 6).

Echant.	Solution		Résine		$K^{Cl}_{NO_3}$
	Cl^-_{meq}	$NO^-_{3\,meq}$	Cl^-_{meq}	NO^-_{3} meq	
PS 1,1D	0,77	3,23	0,23	0,77	1,25
PS 3,8D	0,85	6,15	0,15	0,85	1,27
PS 3,8L	0,85	7,90	0,15	0,85	1,63

Tableau AI. 6

L'inversion d'affinité chlorure-nitrate constatée est donc bien une propriété spécifique de la résine étudiée et ne dépend pas du taux de pontage au DVB.

AI - 2.2. 2). Echange chlorure hydroxyle. Des expériences identiques aux précédentes mais mettant en jeu le couple chlorure hydroxyle, ont permis de déterminer le coefficient d'échange sélectif correspondant à la réaction :

$$Res\ NH_3^+\ Cl^- + OH^-_{sol.} \rightleftarrows Res\ N,\ H_2O + Cl^-_{sol.}$$

Un exemple des résultats obtenus, qui restent très voisins lorsqu'on passe d'une résine à l'autre, permet de mettre en évidence la très grande affinité de la résine base libre pour l'ion chlorure. (Tableau A II . 7)

On voit que K^{Cl}_{OH} augmente en même temps que le rapport $\frac{Res.\ N}{Res.\ NH^+\ Cl^-}$; il sera donc difficile d'obtenir la résine entièrement sous forme base libre à partir du produit chlorhydraté résultant de la préparation. On aura, de ce fait, intérêt à terminer le conditionnement par un lavage à HCl 2N ; on sera alors sûr de disposer d'un produit homogène, entièrement sous forme chlorure pour lequel on évaluera le taux d'azote, donc la capacité théorique.

Solution		Résine			
Cl^-_{meq}	OH^-_{meq}	Cl^-_{meq}	OH^-_{meq}	K^{Cl}_{OH}	log K
0,29	6,5	0,71	0,4	40	1,6
0,10	6,7	0,61	0,6	68	1,8
0,07	$6,9_5$	0,54	0,6	89	1,95

Tableau AI. 7.

Les déterminations expérimentales de concentration en base libre et chlorure ont été faites sur la solution respectivement par potentiométrie et volumétrie au nitrate d'argent ; les quantités de Cl^- ou OH^- présentes dans la résine sont déduites des résultats de dosage en solution ; on remarque que la quantité de base ayant disparu de la solution est toujours légèrement supérieure à la quantité de chlorure élué, ce que l'on attribue à l'effet Donnan.

A partir des deux séries d'expériences précédentes, il est possible de calculer la constante apparente d'échange du couple nitrate-hydroxyle que l'on trouve supérieure à 1 ; en effet :

$$K^{NO_3}_{OH} = K^{NO_3}_{Cl} \times K^{Cl}_{OH} = \frac{K^{Cl}_{OH}}{K^{Cl}_{NO_3}}$$

Il est alors possible d'établir pour les 3 ions étudiés l'ordre d'affinité décroissante suivant :

$$Cl^- > NO_3^- > OH^-$$

AI - 2.2. 3). Echange chlorure acétate : la résine PSD sous forme chlorhydrate étant mise en présence d'une solution acétique de pH 5,95 soit :

$$\underset{6\%}{CH_3CO_2H} \rightleftarrows \underset{94\%}{CH_3CO_2^-} + H^+$$

jusqu'à stabilisation du pH de la suspension agitée constamment, l'analyse de la solution à l'équilibre montre qu'il y a échange des

ions chlorure non avec les ions acétate mais avec les ions hydroxyles : en effet, les résultats expérimentaux (tableau AI. 8) mettent en évidence une élution très importante de chlorure, tandis que la quantité totale d'acétate en solution ne subit qu'une faible variation.

C_o ($CH_3CO_2^-$ + CH_3CO_2H)	pH d'équilibre	Cl^- élué meq	($CH_3CO_2^-$ + CH_3CO_2H) Ce exp.	Ce calc.
4 meq	5,48	0,80	3,92	3,92
2 meq	5,49	0,74	1,82	1,84

Tableau AI. 8

$\frac{CH_3CO_2^-}{CH_3CO_2H}$ Le pH d'équilibre correspond à une valeur du rapport plus faible qu'au départ, donc dénote un déplacement de l'équilibre acide-base ci-dessus vers l'acide non dissocié par suite de la libération de protons parallèle à la pénétration d'hydroxyles dans la résine.

Il y a donc deux équilibres d'échange simultanés :

$$Res\ NH^+Cl^- + AcO^- \rightleftarrows Res\ NH^+AcO^- + Cl^-$$

et

$$Res\ NH^+Cl^- + OH^- \rightleftarrows Res\ N, H_2O + Cl^-$$

Au second, très nettement prépondérant, s'associent le déplacement d'équilibre acide base :

$$CH_3CO_2^- + H^+ \rightarrow CH_3CO_2H$$

et l'équilibre de dissociation de l'eau, si bien que la réaction qui se produit en milieu acétique est finalement essentiellement :

$$Res\ NH^+Cl^- + CH_3CO_2^- \rightleftarrows Res\ N + Cl^- + CH_3CO_2H$$

Le bilan des ions en solution et dans la résine à l'équilibre s'établit comme suit :

Solution			Résine		
$(Cl^-)_{meq}$	AcO^-_{meq}		Cl^-_{meq}	AcO^-_{meq}	$basique_{meq}$
	calcul	exp.			
0,80	3,92	3,92	0,20	0,08	0,72
0,74	1,84	1,82	0,26	0,18	0,56

Tableau AI. 9.

Nous avons vérifié la valeur obtenue expérimentalement pour la quantité totale a d'acide acétique - dissocié ou non - en solution en la calculant par la méthode de Sélégny-Merle.

L'électroneutralité de la solution s'écrit :

$$(CH_3CO_2^-) + (Cl^-) = (H^+) + (Na^+)$$

de plus :
$$\frac{\left[CH_3CO_2^-\right]\left[H^+\right]}{\left[CH_3CO_2H\right]} = K_A = 1{,}76.10^{-5}$$

de ces équations on peut déduire la valeur de a en fonction de quantités aisément mesurables, soit :

$$a = (CH_3CO_2^-) + (CH_3CO_2H) = \left[(Na^+) - (Cl^-) + (H^+)\right]\left(1 + \frac{(H^+)}{K_A}\right)$$

formule dont l'application numérique conduit à un résultat en parfait accord avec l'expérience (tableau AI. 8).

Ce comportement particulier de la résine sous forme chlorure en présence d'une solution aqueuse $\frac{N}{10}$ d'acétate, va donc nous fournir un moyen de régénérer la résine sous forme base libre beaucoup plus sûrement qu'en la mettant en présence d'une solution de base forte. En choisissant un rapport $\frac{\text{meq acétate}}{\text{meq résine}} = 4$, la pénétration des ions acétate dans la résine n'est que de 2%. Ce milieu pourra être utilisé comme milieu tampon lorsqu'il sera

nécessaire de fixer le pH autour de 5,75.

Cet effet, présenté ici sur un exemple correspondant à l'échantillon PSD, existe pour toutes les autres résines étudiées. Il faut, pour qu'il diminue notablement, quaterniser l'amine par action d'iodure de méthyle par exemple. Les ions chlorure libérés par un tel échantillon en présence d'une solution $\frac{N}{10}$ acide acétique/acétate, sont alors remplacés à 70% par des ions $CH_3CO_2^-$, les 30% restant correspondant à la résine sous forme base libre $Res\text{-}\overset{+}{\underset{\underset{CH_3}{|}}{N}}, OH^-$.

AI - 2.3. Courbes de neutralisation. L'étude des courbes de neutralisation par les acides chlorhydrique, nitrique et acétique, a permis d'une part de confirmer les résultats acquis lors des essais précédents, d'autre part de préciser l'influence du taux de pontage du polymère et de la force ionique du milieu sur la cinétique d'échange.

Les courbes présentées dans la suite de cet exposé correspondent à la variation du pH de la solution surnageante après décantation de la résine en fonction du taux de neutralisation τ défini comme étant la quantité d'acide ajoutée par milliéquivalent théorique de résine. Nous avons utilisé cette définition de préférence à celle, souvent adoptée, de quantité d'acide ajoutée par gramme de résine sèche afin de rendre les résultats obtenus pour deux échantillons de capacité théorique différente directement comparables.

Les suspensions contiennent 0,1 meq de résine/cm^3 et leur agitation a été assurée par un barbotage d'azote destiné à éviter toute variation de pH par carbonatation des solutions.

L'importance du cycle d'hystérésis obtenu dans tous les cas lors du tracé des courbes de neutralisation directe et en retour, même lorsqu'on s'assure pour chaque point de la stabilité du pH à $\frac{1}{100}$ d'unité près en 24 heures, met en évidence la lenteur de la mise en

équilibre vrai du polymère avec la solution et par suite la lenteur des échanges. La lenteur des mises en équilibre est encore démontrée expérimentalement lorsqu'on trace, pour un même échantillon, deux courbes de neutralisation directes correspondant l'une à des additions de base forte toutes les 24 heures, l'autre toutes les semaines. La première des deux courbes est systématiquement décalée vers les pH acides et l'on obtient une neutralisation pour 50% seulement de la capacité théorique (figure AI. 8 - courbes 2 et 1).

Une étude complète menée pour les neutralisations par les acides chlorhydrique ou nitrique permet d'aboutir exactement aux mêmes conclusions, aussi ne présenterons-nous que la première des deux séries de courbes (figure AI. 8).

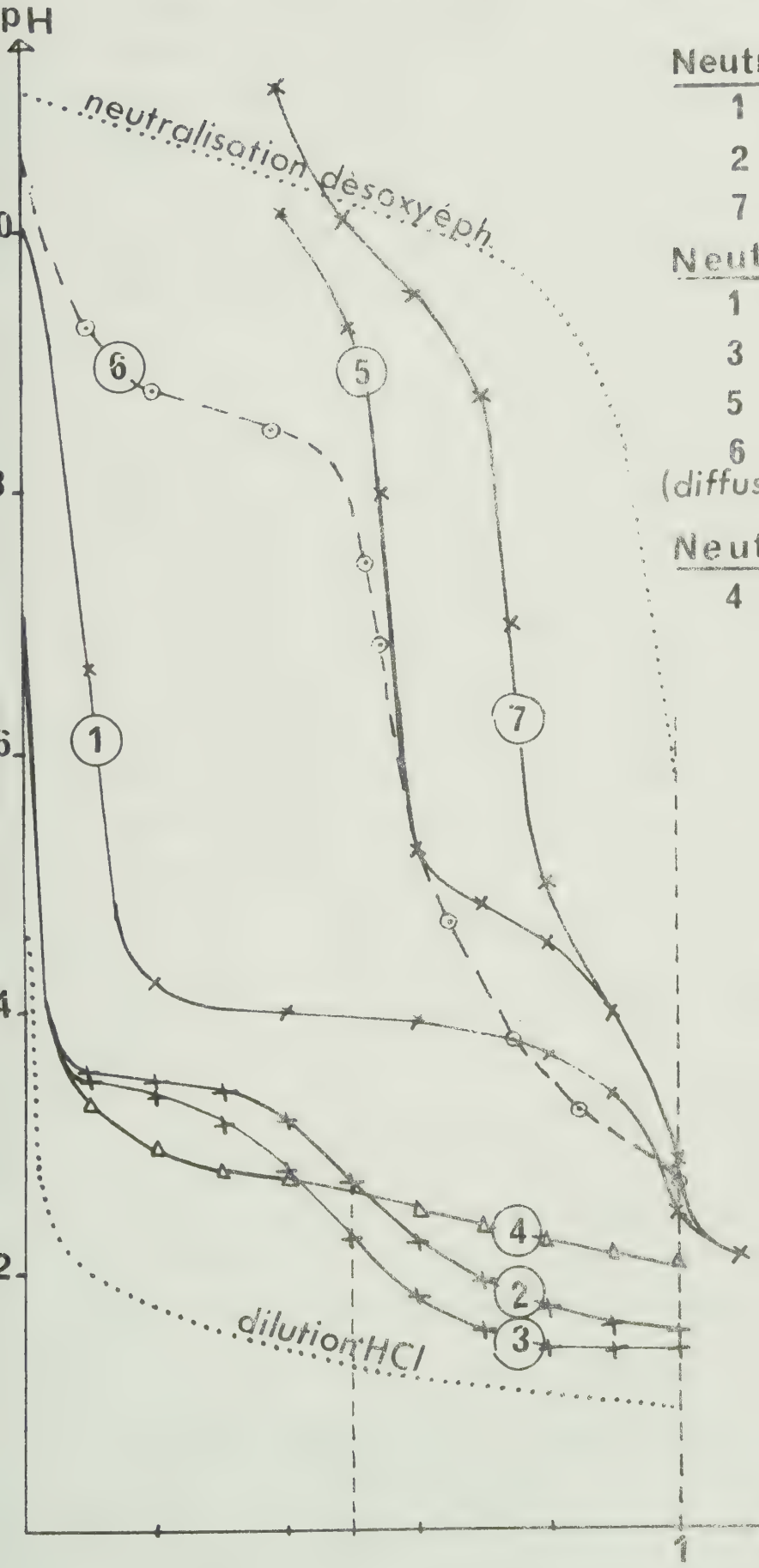
L'examen de cet ensemble de courbes permet d'aboutir aux conclusions suivantes :

1). La position relative des substituants sur le carbone asymétrique (D ou L) n'influence pas le comportement de la résine vis à vis d'ions ne présentant pas de possibilités d'isomérie optique : les courbes sont confondues pour les résines D ou L de même taux de pontage si elles sont tracées dans les mêmes conditions.

2). Les courbes de neutralisation directes ne permettent d'établir aucune distinction entre les deux polymères de faible taux de pontage (courbe 1 pour PS 1,1 ou 3,8) mais le polymère à 16% de DVB présente une affinité pour l'ion chlorure très affaiblie (courbe 4 décalée vers la courbe de dilution de HCl) ; par contre les courbes de neutralisation en retour se différencient lorsqu'on passe de 1,1 à 3,8% de DVB (courbes 7 et 5) ; le deuxième point d'équivalence passe de $\tau \sim 0,75$ à $\tau = 0,55$, ce qui montre que le chlorure est plus solidement fixé dans le premier cas. On peut donc dire que l'affinité pour un anion tel que Cl^- ou NO_3^- diminue lorsque le taux de pontage augmente, ce qui s'explique par une difficulté de pénétration d'ions qui s'accroît avec la réticulation. L'allure de ces courbes de neutralisation

Courbes de neutralisation des résines

PS 1,1 - 3,8 et 16, D ou L, par HCl N



Neutralisation PS 1,1

1 directe ⇄ pH

2 " hors ⇄ pH

7 en retour ⇄ pH

Neutralisation PS 3,8

1 directe ⇄ pH

3 " hors ⇄ pH

5 en retour ⇄ pH

6 " " : " "

(diffusion lente de base)

Neutralisation PS16

4 directe ⇄ pH

Fig. AI.8

en retour, avec plusieurs points d'équivalence, démontre que tout le chlorure ne décroche pas avec la même facilité. Pour nous assurer que la brusque augmentation de pH lors de l'addition de base forte ne provoquait pas de contraction de la résine avec effet cinétique, nous avons dans un cas fait diffuser lentement de la potasse dans la solution de résine par l'intermédiaire d'un boyau de dialyse (courbe 6) ; la courbe obtenue présente exactement les mêmes caractéristiques que la précédente.

La figure (AI. 9) met en évidence l'influence de la force ionique du milieu sur l'échange chlorure-hydroxyle dans le cas du PSD, les courbes étant tracées dans un état proche de l'équilibre. On voit que l'addition d'un sel neutre de l'anion à échanger en concentration moyenne favorise la pénétration de cet anion (courbe 2 à des pH > courbe 1), mais que, si la concentration en sel neutre devient plus importante (courbe 3), il y a régression de cet effet qui peut s'expliquer par une contraction de la résine avec effet cinétique. La présence d'un sel neutre de l'anion échangeable dans la solution exclut évidemment toute possibilité d'obtention de la courbe de neutralisation en retour, l'équilibre :

$$\text{Res N, } H_2O + Cl^-_s \quad \rightleftarrows \quad \text{Res } NH^+ Cl^- + OH^-_s$$

restant constamment déplacé vers la droite, ce qui explique l'allure des courbes 2' et 3'.

Notons que la comparaison des courbes de neutralisation établies dans les mêmes conditions par deux acides différents, permet d'obtenir la valeur des coefficients d'échange sélectif des deux anions impliqués. E. Sélégny a démontré en effet que pour deux solutions A et B ayant même concentration anionique, on peut écrire :

$$(pH)_A - (pH)_B = \log K^A_B$$

formule dont l'application aux courbes (AI. 10) correspondant au couple

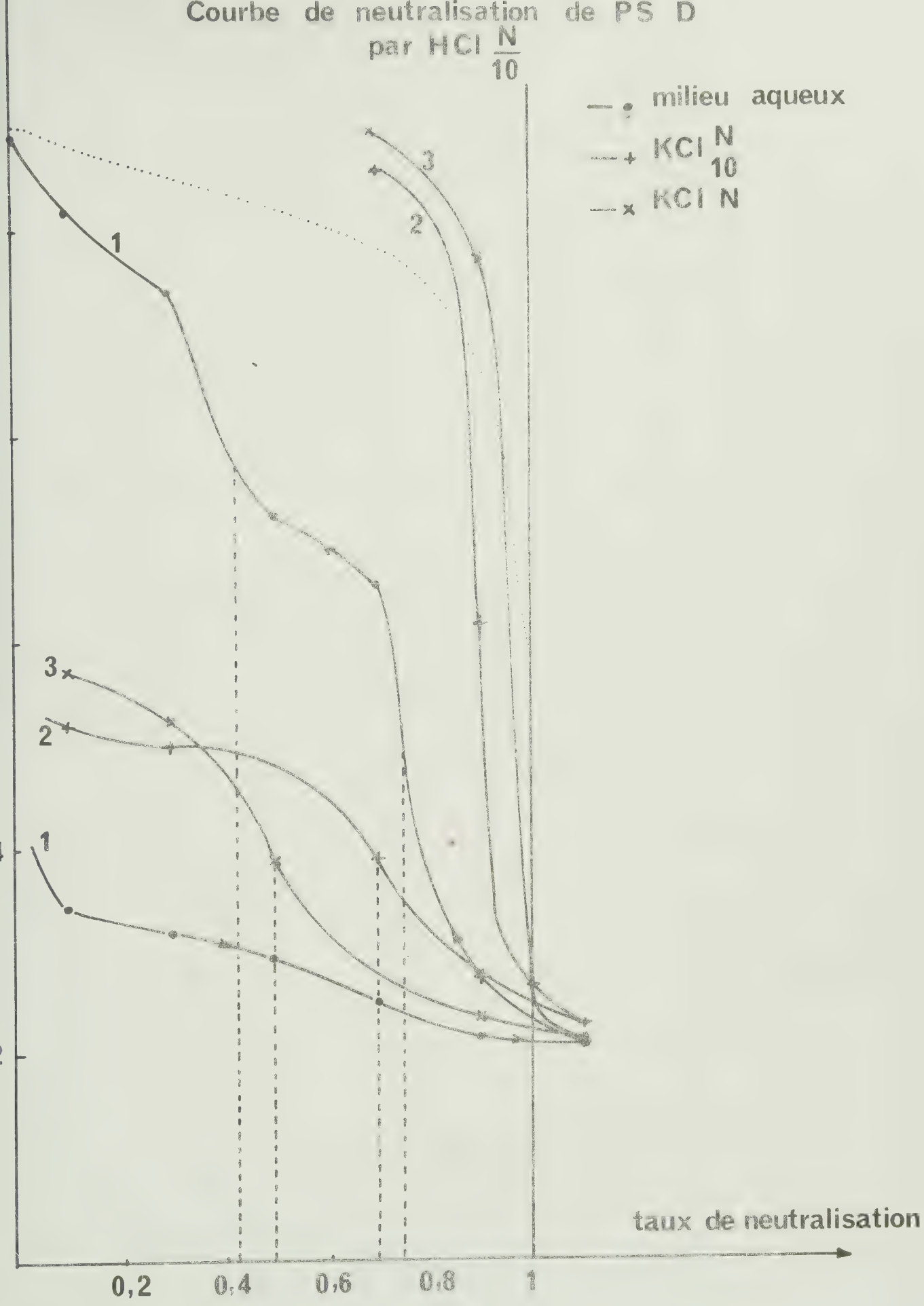

Courbe de neutralisation de PS D
par HCl N/10
milieu aqueux
KCl N/10
KCl N
1
2
3
3
2
1
taux de neutralisation
0,2
0,4
0,6
0,8
1

Fig A I 9

τ	pH_{Cl^-}	$pH_{NO_3^-}$	$\log K^{Cl}_{NO_3}$	$K^{Cl}_{NO_3}$
0,1	6,6	2,6	4	10^4
0,3	4	2	2	10^2
0,5	3,95	1,75	2,20	$1,6.10^2$
0,7	3,80	1,65	2,15	$1,4.10^2$
0,9	3,40	1,60	1,8	63
1	2,45	1,60	1,85	71

Tableau AI. 10

NEUTRALISATION des PS 1,1 ou 3,8 par :

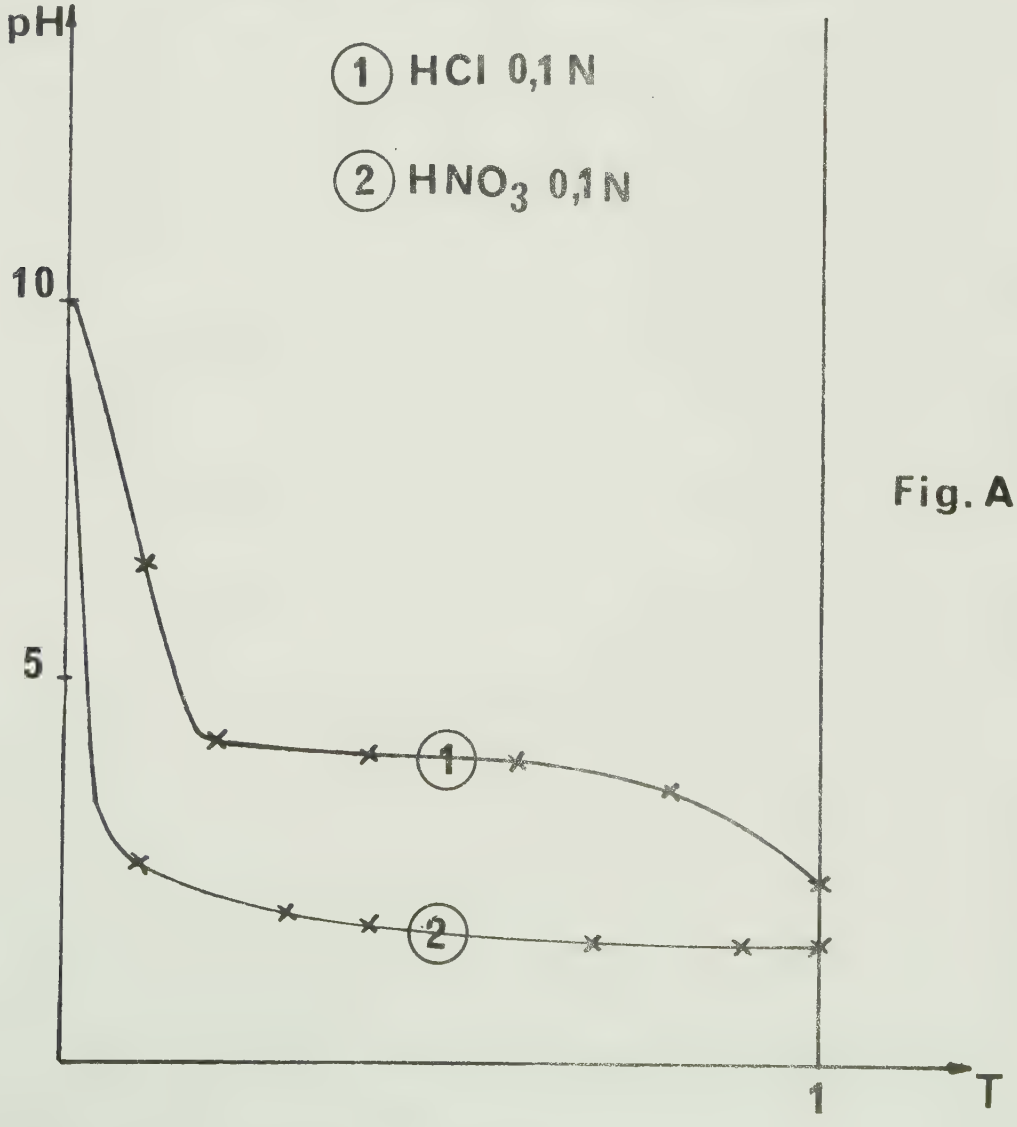


Fig. AI.10

chlorure-nitrate, conduit aux résultats du tableau (AI. 10), valables pour les résines PS 1,1 et 3,8.

La valeur obtenue pour $K_{NO_3}^{Cl}$ reste homogène et voisine de 10^2 si l'on exclut le premier point. Elle confirme les résultats obtenus lors d'échange direct chlorure-nitrate.

Nous avons terminé cette étude des courbes de neutralisation par des acides non asymétriques par le cas de l'acide acétique. On retrouve alors exactement la courbe de dilution de cet acide dans la solution, ce qui confirme que les ions acétate ne pénètrent pas dans la résine.

Cette étude des courbes de neutralisation a donc permis de confirmer ou même de préciser certaines des conclusions établies lors d'échanges d'ions. Elle démontre d'autre part que la pénétration d'ions dans la résine devient très difficile lorsqu'on augmente trop le taux de pontage (PS 16) ; il est donc impératif d'utiliser un polystyrène peu ponté comme support lors des essais de séparations d'anions organiques beaucoup plus volumineux que les ions chlorure. Les résultats obtenus en présence d'acétate faisaient d'ailleurs naître quelque inquiétude quant aux possibilités d'existence de tels échanges, comme nous l'avons déjà mentionné.

Bibiographie.

AMARIGLIO A. Thèse doctorat d'Etat, Nancy. 1967.

GRIFFIN ; JONES Ind. Eng. Chem. Nov. 1952, 2687.

INOUE SHOKEI Kobunshi 1969, 18 , (210) 596.

KORSHAK V.V. ; ROGOZHIN S.V. ; DAVANKOV V.A. ; MASLOVA L.
Sen. Svoistva Ionoobmen. Mater. 1968, 49, 53.

MING CH'EN CHIANG ; PANGLI J. Chinese Chem. Soc. 1951, 18, 182.

OGATA a). J. Pharm. Soc. Japan 1919, 451, 751.
b). C.A. 1920, 14 , 745.

PERMUTIT Co. Ltd Boit. 816-653, 15.7.

PEPPER et al. J. of Chem. Soc. 1953, 4097.

ROGOZHIN S.V. ; DAVANKOV V.A. ; Russian Chem. Reviews 1968,
37 , (7) 565.

ROUSSILLON J.P. DES Sc. Phys. Rouen 1965.

SCHLULZ R.C. Encycl. Polym. Sci. Technol. 1968, 9, 507.

SELEGNY E. Thèse doctorat d'Etat, Paris 1956.

SELEGNY E. ; MERLE Y. C.R. Acad. Sc. 1963, 256 , 674.

SUDA H. ; ODA R., Mem. Fac. Tech. Kanazawa Univ. 1960, 2, 215.

TREMILLON B. Les séparations par résines échangeuses d'ions.
Gauthier Villars 1965.

TROSTYANSKAYA E.B. ; MENDELEV D.I. Chem. Technol. Inst. Moscow
Khim. Prom. 577. 80.

TSUBOYAMA S. ; YUKI G. Kagaku Kyokai Shi 1969, 27 (3) 827.

UTSUNOMIYA YOCHI ; TABATA TABUE ; KUYAMA HIROSHI Kobunshi
Kagaku 1968, 25 (279) 419.

ANNEXE II

METHODES DE MESURES

AII - 1. Méthodes de détermination des concentrations d'ions en solution .

Lors des différentes expériences d'échange d'ions effectuées dans les chapitre I, et Annexe I, nous avons été amenés à déterminer les concentrations des divers anions en solution ; les concentrations de ces mêmes anions dans la résine ont été déduites par le calcul des mesures en solution.

AII - 1.1. Dosage des chlorures. Pour les échanges faisant intervenir les chlorures, nous avons utilisé d'une part des dosages acidimétriques classiques permettant d'atteindre la quantité totale d'anions en solution, d'autre part des dosages argentimétriques de l'ion Cl^- (par une solution de $Ag\,NO_3$ de titre connu en présence de $K_2\,Cr_2\,O_7$ comme indicateur).

AII - 1.2. Dosage des hydroxyacides par oxydation. Dans le cas où l'anion échangé avec le chlorure est un ion malate ou tartrate, nous avons vérifié que la différence entre les deux dosages considérés ci-dessus permettait bien d'atteindre la concentration en malate ou tartrate en effectuant un dosage direct de chacun de ces anions par oxydation suivant la méthode décrite par A.J. Courtoisier et J. Ribereau Gayon. Cette méthode est basée sur l'oxydabilité à chaud et en milieu sulfurique concentré des α hydroxyacides par des oxydants puissants tels que $Cr_2O_7^{=}$ pour l'acide tartrique et Ce^{4+} pour l'acide malique suivant les réactions :

$$3\,CO_2H - CHOH - CHOH - CO_2H + 5\,Cr_2O_7^{=} + 40\,H^+ \rightarrow 12\,CO_2 + 29\,H_2O + 10\,Cr^{3+}$$

et :

$$CO_2H - CHOH - CH_2 - CO_2H + 12\,Ce^{4+} + 3\,H_2O \rightarrow 4\,CO_2 + 12\,Ce^{3+} + 12\,H^+$$

après réaction, on dose par le sel de Mohr l'excès d'oxydant restant en solution.

Un tel dosage ne peut être effectué systématiquement sur tous les essais en raison des temps de chauffage nécessaires (30 minutes pour le premier et 1heure 30 à reflux pour le deuxième), mais a été utilisé à titre de vérification. Nous ne nous étendrons pas ici sur les détails expérimentaux bien décrits par Courtoisier et al.

Le seul vrai problème de dosage auquel nous nous sommes trouvés confrontés, a été celui de la détermination d'excès éventuel d'un énantiomère dans la solution. Nous avons vu que la seule propriété différenciant deux inverses optiques est leur action sur la lumière polarisée ; il ne sera donc possible de distinguer ces deux composés qu'à partir des différences de pouvoir rotatoire. Or il n'est pas possible de relier directement le pouvoir rotatoire d'un α hydroxyacide succinique en solution à sa concentration. En effet, ce pouvoir rotatoire est, comme nous l'avons déjà indiqué, très faible, ne suit pas la loi de Biot et est largement influencé par les conditions de milieu telles que pH, nature du cation associé, température.... (24). Il est par suite impossible de tracer une courbe $\alpha = f(C)$. Nous avons donc dû passer par l'intermédiaire des complexes que peuvent former les α hydroxyacides avec les molybdates et entreprendre l'étude systématique de leurs pouvoirs rotatoires.

AII - 1.3. Etude du pouvoir rotatoire de complexes molybdomaliques et molybdotartriques. Les α hydroxyacides, en présence de molybdate sont en effet susceptibles de former un ou plusieurs anions complexes (Darmois ; tableau AII. 1) dont les solutions ont un pouvoir rotatoire, caractéristique du nouvel anion formé, considérablement exalté par rapport à celui de l'acide de départ et variant linéairement en fonction de la concentration tout au moins en milieu dilué.

Les complexes molybdomaliques et molybdotartriques ont fait l'objet de nombreuses études qui mettent toutes en évidence la nécessité d'opérer à pH ≤ 6 pour obtenir une complexation.

Auteur	$Mo_{Mal.}$	$Mo_{Tart.}$	Domaine d'existence
Baillie et Brown	1/1		pH < 6,2
Baillie et Brown		1/1	pH < 7,5
Clark		1/2	pH < 6,5
Jacobsohn	1/1		abs. CH_3CO_2H } 2,2 < pH < 5
	1/2		prés. CH_3CO_2H }
Chalmers et Sinclair		1/1	
Cadiot et Souchay		1/1	
Brown et Mc Lellan		1/1	pH $\sim$ 4
Pyatniskii		1/1	1 < pH < 12
Poraikoshitz	2/1		
Krishnaiah		1/1	
Kolli et al.	2/1		

Tableau AII. 1.

Nature et Domaines d'existence des complexes molybdate-malate ou tartrate.

On a pu isoler ainsi un complexe Mo - A 1-2 ne se formant pratiquement pas en solution et un second complexe plus stable de composition 1-1 ou 2-1 suivant les auteurs. Il semble que dans le cas du malate le complexe le plus probable soit 2-1 (Kolli et al., Poraikoshitz) alors que l'ion tartrique donnerait plutôt naissance à un complexe 1-1 (tableau AII. 1.) ; dans ce dernier cas, Mme Cadiot et Souchay ont démontré par potentiométrie qu'il ne pouvait y avoir de complexe plus riche en tartrate que 1-1.

Les composés obtenus étant d'autant moins stables que la solution est plus diluée, on déplace l'équilibre :

$$x\ Mal^{=} + 2\ x\ Mo\ O_3 \rightleftarrows \left[(Mal, 2\ Mo\ O_3)\right]_x$$

ou

$$x\ Tart^{=} + x\ Mo\ O_3 \rightleftarrows \left[(Tart, Mo\ O_3)^{=}\right]_x$$

dans le sens de la formation du complexe en ajoutant un excès de molybdate sous forme de paramolybdate d'ammonium tel que l'on ait 10 Mo/mole d'acide. Dans ces conditions la gamme des concentrations en acide que l'on pourra étudier est limitée à 0,04 M l^{-1} au plus par la solubilité du paramolybdate d'ammonium (0,4 Mo/l à saturation). Remarquons que, pour une gamme de concentrations en acide 10^{-3} à 4.10^{-2} M l^{-1}, les solutions préparées contiendront de 10^{-2} à 4.10^{-1} Mo/l ; dans de telles conditions l'ion molybdate se trouve en solution sous forme très condensée, vraisemblablement $Mo_7O_{24}^{6-}$ et donne certainement naissance à des complexes de $x > 1$.

Du point de vue appareillage, nous avons utilisé pour nos déterminations expérimentales :

- soit un polarimètre électronique Jouan ou Perkin Elmer permettant l'un et l'autre de mesurer des pouvoirs rotatoires à 4 longueurs d'onde (589, 546, 436 et 365 nm) suivant le filtre placé sur le trajet du rayon lumineux et donnant les pouvoirs rotatoires α des solutions à 10^{-3} degré près.

- soit un spectropolarimètre spectropol I Fica qui permet de tracer la courbe complète de dispersion rotatoire jusqu'à 300nm et même 200nm lorsque la solution étudiée n'absorbe pas trop fortement la lumière vers les faibles longueurs d'onde ce qui n'était pas le cas ici.

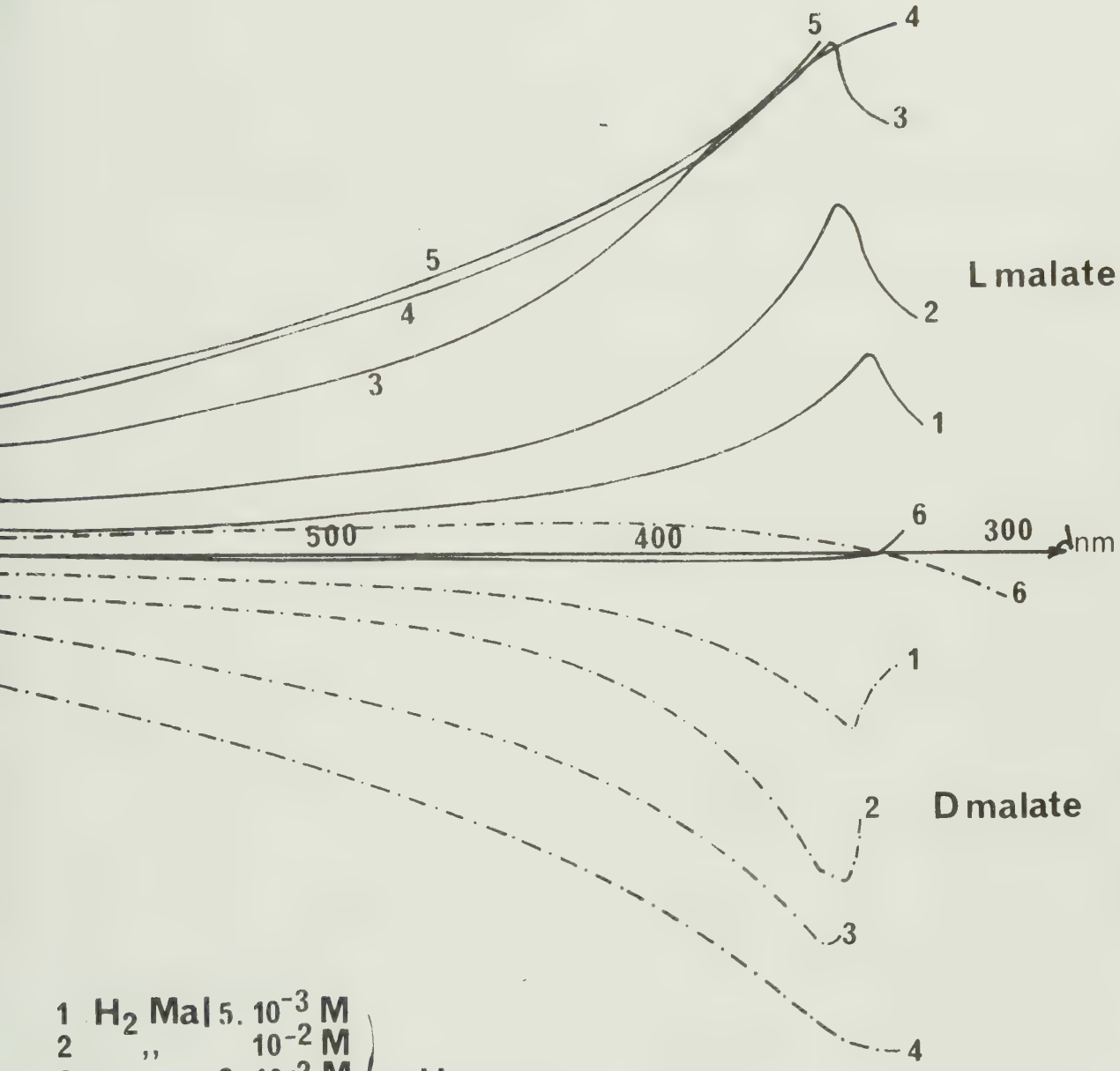
AII - 1.3. 1). Etude des complexes molybdomaliques. L'ensemble des courbes ORD obtenues pour différentes concentrations de complexes et pour les ions L ou D maliques non complexés sont présentées sur le graphique (AII. 1). Elles mettent en évidence que :

1). Il y a bien une très forte exaltation de pouvoir rotatoire du malate par addition de molybdate qui ne peut qu'être spécifique de l'ion complexe formé (le molybdate n'ayant aucune activité optique). On observe, pour une concentration donnée, une symétrie parfaite entre les courbes correspondant aux ions molybdo L malique et molybdo D malique ; cette symétrie n'est pas respectée pour une seule concentration de malate ($c = 2.10^{-2}$ M) mais il semble que dans ce cas la courbe ORD relative au L malate présente un profil anormal vers les faibles longueurs d'onde. Toutes ces courbes ont été tracées à partir de solutions tamponnées à pH 4,8 - 4,9. Il sera en effet indispensable de fixer le pH avec grand soin avant toute détermination de pouvoir rotatoire car, d'une part, dès que le milieu devient fortement alcalin on n'observe plus d'augmentation du pouvoir rotatoire (courbe 6 figure AII. 1), ce qui s'explique par l'instabilité du complexe dans un tel milieu - d'autre part, même dans la zone de stabilité du complexe (pH < 6) le pH influence très largement le pouvoir rotatoire comme le montrent les deux séries de courbes $\alpha°/cm = f\left[\overline{L\ mal.}\right]$ tracées pour trois longueurs d'onde et à 2 pH (figure AII. 2).

2). Pour une concentration donnée, le pouvoir rotatoire augmente beaucoup lorsque la longueur d'onde diminue ; il ne semble pas toutefois que l'on ait intérêt à travailler à la plus faible longueur d'onde possible (436 nm) car la loi de Biot est respectée sur une plus grande gamme de concentrations si l'on se place à λ = 589 nm (raie D du sodium) ou 546 nm. De plus les oscillations du compteur de lecture sur le polarimètre Perkin Elmer, que nous avons le plus souvent utilisé pour les déterminations systématiques d'excès d'un énantiomère, deviennent très importantes à 436 nm et l'imprécision

°/cm

Pouvoirs rotatoires de complexes molybdo - maliques



1	H_2 Mal	5.10^{-3} M	
2	,,	10^{-2} M	
3	,,	2.10^{-2} M	pH 4,8 - 4,9
4	,,	3.10^{-2} M	
5	,,	4.10^{-2} M	
6	,,	4.10^{-2} M	pH 12,5

Fig A II . 1

/cm

Pouvoirs rotatoires de solutions L malique
en présence de paramolybdate d'ammonium

pH 4,8 ___ pH 5,8 _.-.-.

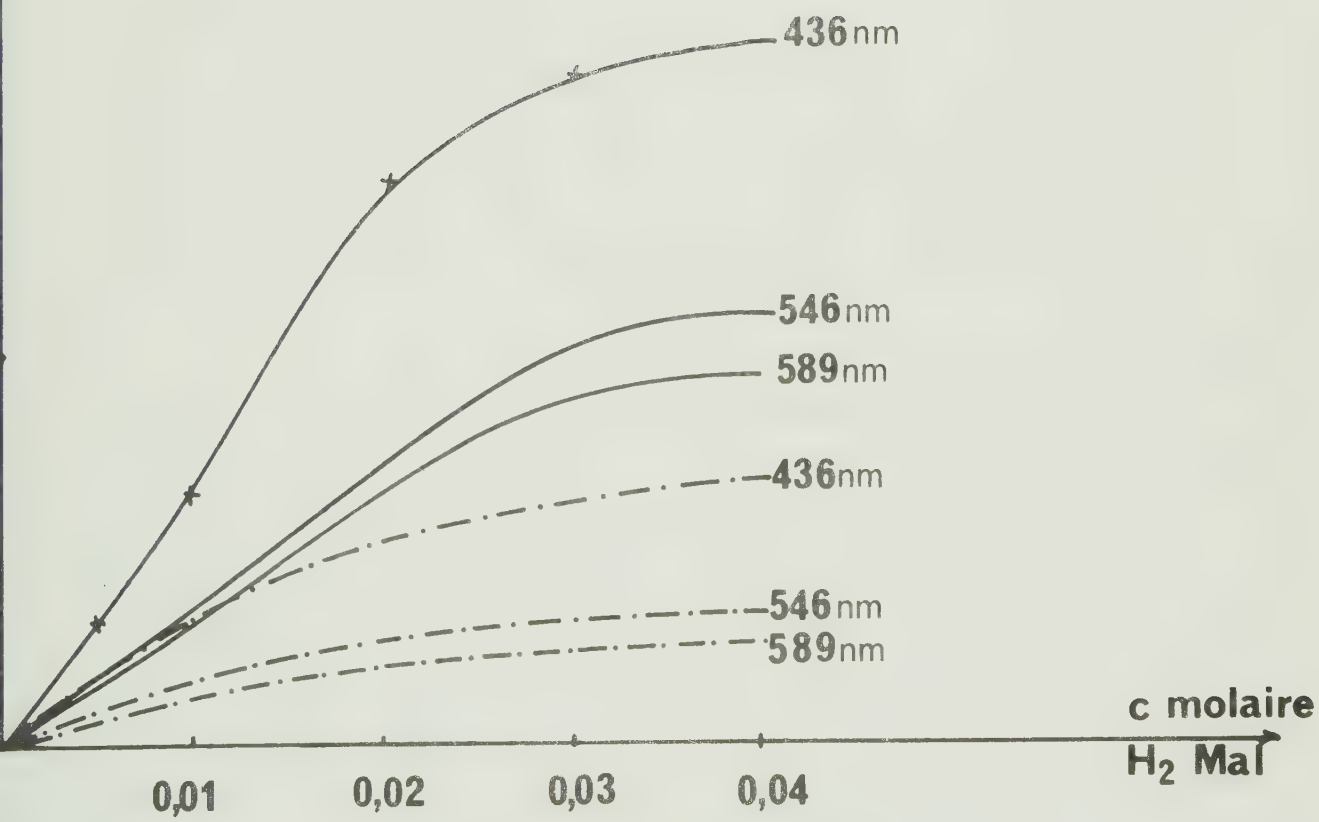


Fig. A II. 2

sur la lecture augmente.

3). Cette méthode ne permettra pas d'obtenir les concentrations en malate D ou L au-dessus de $c = 3.10^{-2}$ M ; en effet, à partir de cette valeur, le pouvoir rotatoire de la solution devient pratiquement indépendant de la concentration ; on peut supposer que la totalité du malate n'est plus complexé aux concentrations supérieures.

Il faudra donc, lors des déterminations d'un excès éventuel d'énantiomère, travailler sur des solutions de concentration globale en malate (D ou L) au maximum égal à 3.10^{-2} M.

Pratiquement nous avons effectué les mesures sur de telles solutions dont le pH était ajusté à 4,8 ou 5,8 suivant le pH de la solution de départ, par de l'ammoniaque. Le pouvoir rotatoire étant beaucoup plus faible à pH 5,8, nous avons dans ce cas utilisé des cuves de chemin optique $d = 10$ cm lorsque la quantité de solution disponible le permettait. Pour les essais à pH 4,8 des cuves de 2 cm seulement ont été employées.

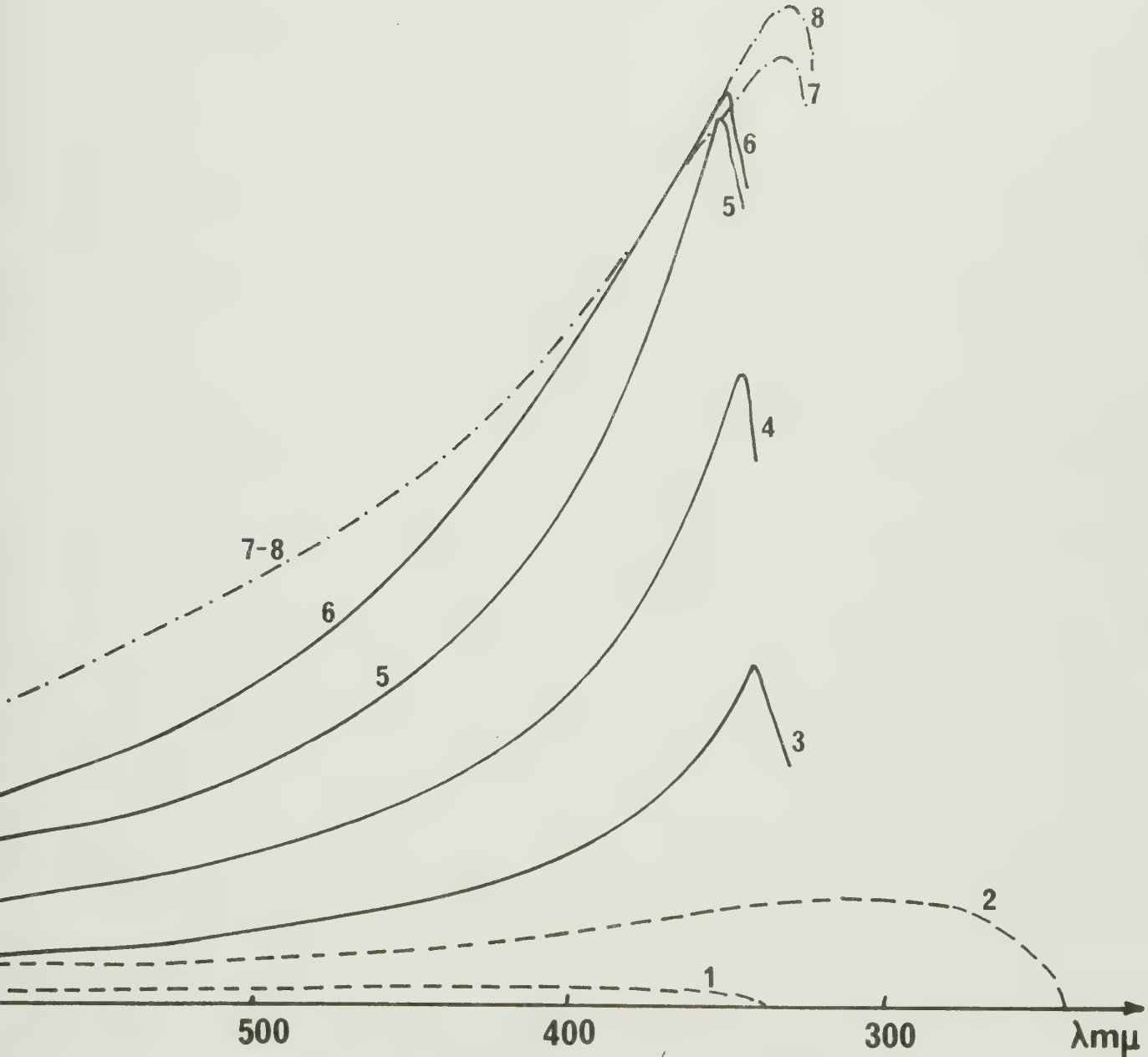
Nous avons par ailleurs vérifié que les ions $CH_3CO_2^-$ souvent présents dans nos solutions n'influençaient pas la valeur du pouvoir rotatoire de cette solution, bien sûr pour des mêmes conditions de pH. par contre, comme nous l'avons signalé précédemment, la présence de chlorure dans le milieu entraîne une précipitation lors de l'addition de molybdate qui empêche toute détermination polarimétrique ; cette précipitation est peut être due à la formation d'un complexe ternaire Mo - Mal - chlorure.

AII - 1.3. 2). <u>Etude des complexes molybdotartriques</u>. Nous avons ensuite repris les mêmes essais que ci-dessus dans le cas des <u>complexes molybdotartriques</u> . Ils permettent dans l'ensemble d'aboutir aux mêmes conclusions que ci-dessus comme le montrent les courbes présentées sur les figures (AII. 3 et AII. 4) qui

m

Fig A II. 3

Pouvoirs Rotatoires de solutions de complexe molybdo- d tartrique



H_2T *milieu aqueux* $pH=2,25$
„ „ KOH 2N $pH=12$
Mo/H_2T 0,005M
Mo/H_2T 0,01 M

5 : Mo/H_2T 0,015M
6 : „ „ 0,02 M
7 : „ „ 0,03 M
8 : „ „ 0,04 M

3 à 8 : $pH=4,5$

Variation du pouvoir rotatoire de solutions de complexes molybdotartrique $\left(\frac{Mo}{T} = 10\right)$ en fonction de la concentration

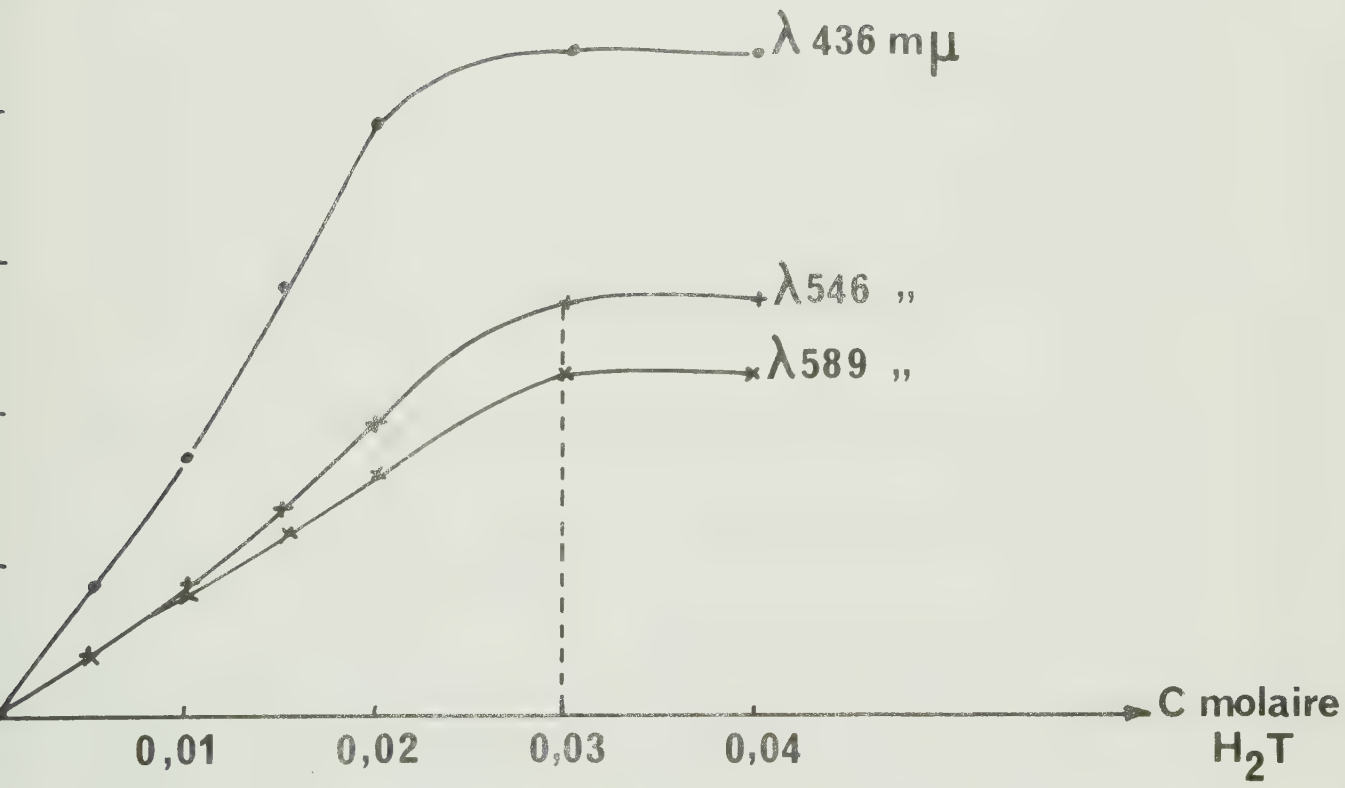


Fig A II. 4

sont tout à fait semblables à celles relatives aux complexes molybdomaliques. Il semble même que la présence d'un OH supplémentaire dans la molécule de tartrate (par rapport à la molécule de malate) n'influence pratiquement pas la valeur du pouvoir rotatoire mesuré par un même ensemble de conditions expérimentales, puisque les courbes ORD obtenues dans les deux cas sont quasiment superposables. Seule l'influence du pH, pour les milieux légèrement acides, ne se retrouve pas dans le cas présent et les courbes $\alpha = f(c)$ représentées sur la figure (AII. 3) sont valables pour tous pH compris entre 4 et 6.

Notons enfin que le cation associé à l'ion tartrate de départ n'interfère pas sur la valeur de α obtenue. Des mesures de α ont en effet été effectuées sur des solutions préparées à partir d'acide tartrique, de tartrate de potassium ou de tartrate de magnésium auxquelles on a ajouté du paramolybdate d'ammonium et de l'ammoniaque pour ajuster le pH. La présence d'ion K^+ ou Mg^+ dans la solution ne modifie pas la valeur du pouvoir rotatoire α obtenu lorsque le cation NH_4^+ est seul présent dans le milieu, toutes autres conditions de concentration et pH étant bien sûr identiques.

AII - 2. Détermination des concentrations des oses utilisés.

AII - 2.1. Dosage du glucose. Pour doser le glucose, nous avons utilisé deux méthodes :

- l'une, non enzymatique permet de doser indifféremment l'α et le β glucopyrannose D ou L. Elle est basée sur la formation d'un composé coloré bleu-vert résultant de la réaction en milieu acétique et à chaud du glucose sur l'o.toluidine ; le spectre d'absorption de cette solution présente un pic à 630nm et la densité optique mesurée à cette longueur d'onde est proportionnelle à la concentration initiale de glucose.

$$d.o_{mes.} = d.o_{étalon} \times Sgl^{-1}$$

la solution étalon renfermant 1 gl^{-1} de glucose. Pratiquement on utilise la technique suivante ; on mélange :

0,4 ml de solution à doser ou de glucose étalon
2 ml d'o.toluidine 0,07M dans l'acide acétique.

On bouche les tubes et on porte 10 minutes au bain marie bouillant ; on refroidit immédiatement sous un courant d'eau froide et on mesure la densité optique de la solution au bout de 10 minutes, le témoin renfermant de l'o.toluidine 0,07M dans l'acide acétique. On en déduit la concentration en glucose de la solution.

- l'autre méthode, enzymatique, est basée sur l'oxydation du glucose en acide gluconique en présence de glucose oxydase (c'est à dire sur l'utilisation à des fins analytiques de la réaction étudiée au début du chapitre II) suivie d'une réduction de l'eau oxygénée formée par l'o.dianisidine qui aboutit à la formation d'un composé coloré :

$$H_2O + \text{glucose} + O_2 \xrightleftharpoons{\text{glucose oxydase}} \text{acide gluconique} + H_2O_2$$

$$H_2O_2 + \underset{\text{incolore}}{DH_2} \xrightarrow{\text{peroxydase}} 2\,H_2O + \underset{\text{coloré}}{D}$$

la densité optique de la solution colorée résultant de ces 2 réactions, mesurée à 450 nm, est proportionnelle à la concentration initiale de glucose si cette dernière ne dépasse pas $10^{-2}\,Ml^{-1}$. Le mode opératoire est conforme à la description faite par H.V. Bergmeyer. Cette méthode est spécifique du βD. glucopyrannose.

AII - 2.2. Dosage du fructose. Les dosages de fructose ont été effectués par la méthode de ROC en suivant la technique ci-après :

A 2ml de solution de fructose de concentration C telle que $10^{-4}\,Ml^{-1} \leq C \leq 10^{-3}Ml^{-1}$, on ajoute 1ml de réactif (constitué

Variation du pouvoir rotatoire de solutions de fructose avec la concentration

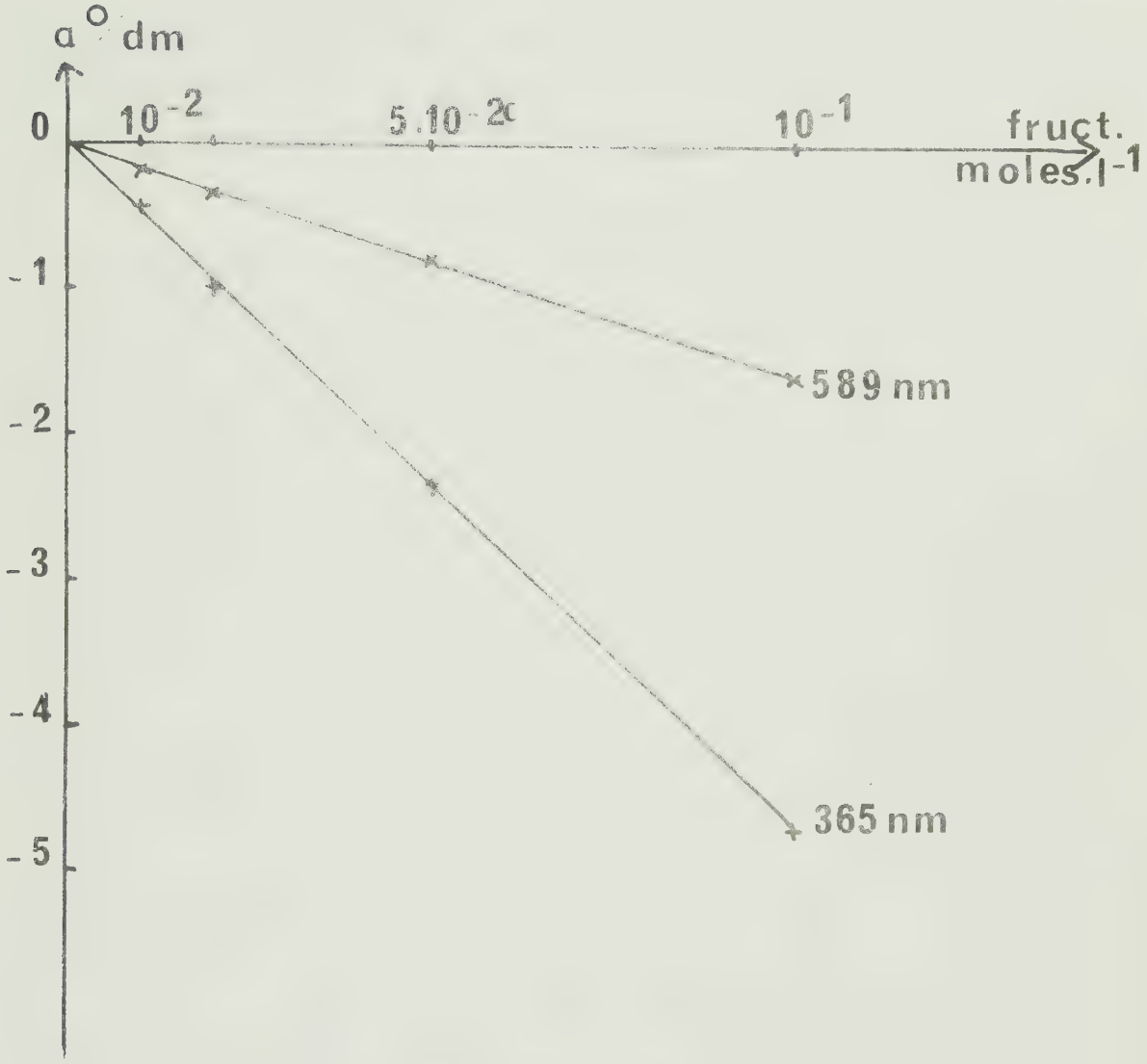


Fig. A II.5

par un mélange de 0,1 g de résorcine et 0,25 g de thiourée dans 100 ml d'acide acétique glacial) puis 7 ml d'HCl $2Ml^{-1}$. On porte le mélange ainsi obtenu à 80°C pendant 10 minutes puis on refroidit énergiquement. La solution obtenue, colorée, a, à 520nm, une densité optique proportionnelle à la concentration initiale de fructose.

Dans le cas où nous avons travaillé sur des solutions de D fructose pures (non mélangées au D glucose) nous avons effectué des mesures polarimétriques directement sur la solution, méthode beaucoup plus rapide que la précédente. Le pouvoir rotatoire des solutions aqueuses de fructose varie en effet avec la concentration en suivant la loi de Biot conformément aux droites présentées pour deux longueurs d'onde sur la figure (AII. 5). Sur quelques échantillons nous avons effectué un dosage pour chacune des deux méthodes décrites afin de s'assurer de la concordance des résultats obtenus.

Remarquons ici que nous n'avons jamais effectué de mesure de pouvoir rotatoire que sur les solutions de glucose, celui-ci évoluant au cours du temps par suite de la mutarotation $\alpha \rightleftarrows \beta$.

AII - 3. Déterminations expérimentales sur enzymes.

AII - 3.1. Spectre d'absorption de la glucose oxydase.

Une solution de FAD présente un spectre d'absorption proche UV-visible ayant les caractéristiques suivantes :

- 2 pics à fort coefficient d'extinction dans le proche UV à 220nm et 265nm.

- 2 pics dans le visible à 372 et 450nm.

Le pic à 450nm, caractéristique de la flavine oxydée, disparaît après réduction de cette dernière.

Une solution aqueuse de glucose oxydase est totalement absorbante dans l'UV, par contre son spectre d'absorption

présente les 2 pics caractéristiques du groupement flavinique dans le visible, l'un, légèrement déplacé, à 380nm, l'autre à 450nm exactement. Les expériences de Swoboda et Massey sur un produit purifié avec le plus grand soin ont permis de déterminer le coefficient d'extinction de la glucose oxydase (sous forme oxydée, à 450nm) soit :

$$\varepsilon_{450} = 1,4.10^{4} M^{-1} l$$

Des expériences de dénaturation de la glucose oxydase ont permis à ces mêmes auteurs de s'assurer que l'apoenzyme n'absorbe pas la lumière à 450nm. Il semble que la liaison du FAD à la protéine exalte légèrement l'absorption caractéristique de la flavine puisqu'après dénaturation de l'enzyme et séparation, la flavine isolée a une densité optique égale à 93,75% de la $d.O_{450}$ de la glucose oxydase de départ.

Nous avons vérifié que les échantillons de glucose oxydase dont nous disposions possédaient en solution aqueuse, un spectre d'absorption présentant bien les raies caractéristiques ci-dessus (figure AII. 6).

Ces spectres nous ont en outre permis de vérifier la tenuer en catalase des échantillons d'enzyme grâce à l'existence d'une raie à 400 - 410nm caractéristique de la catalase.

On voit que l'allure du spectre de la G.O. de pureté (I) est très semblable à celle du spectre de référence du FAD ; par contre elle est entièrement modifiée dans le cas de la G.O. de pureté II ; la quantité de catalase présente est alors assez importante et le spectre obtenu pour la G.O. est alors la superposition des 2 spectres spécifiques de la G.O. elle-même et de la catalase. On voit donc que lorsque la présence de catalase risque d'être gênante, il faudra impérativement utiliser la glucose oxydase de pureté I.

L'existence de la raie d'absorption à 450nm est pour nous particulièrement intéressante puisqu'elle permettra, malheureusement uniquement en solution de suivre l'oxydoréduction de

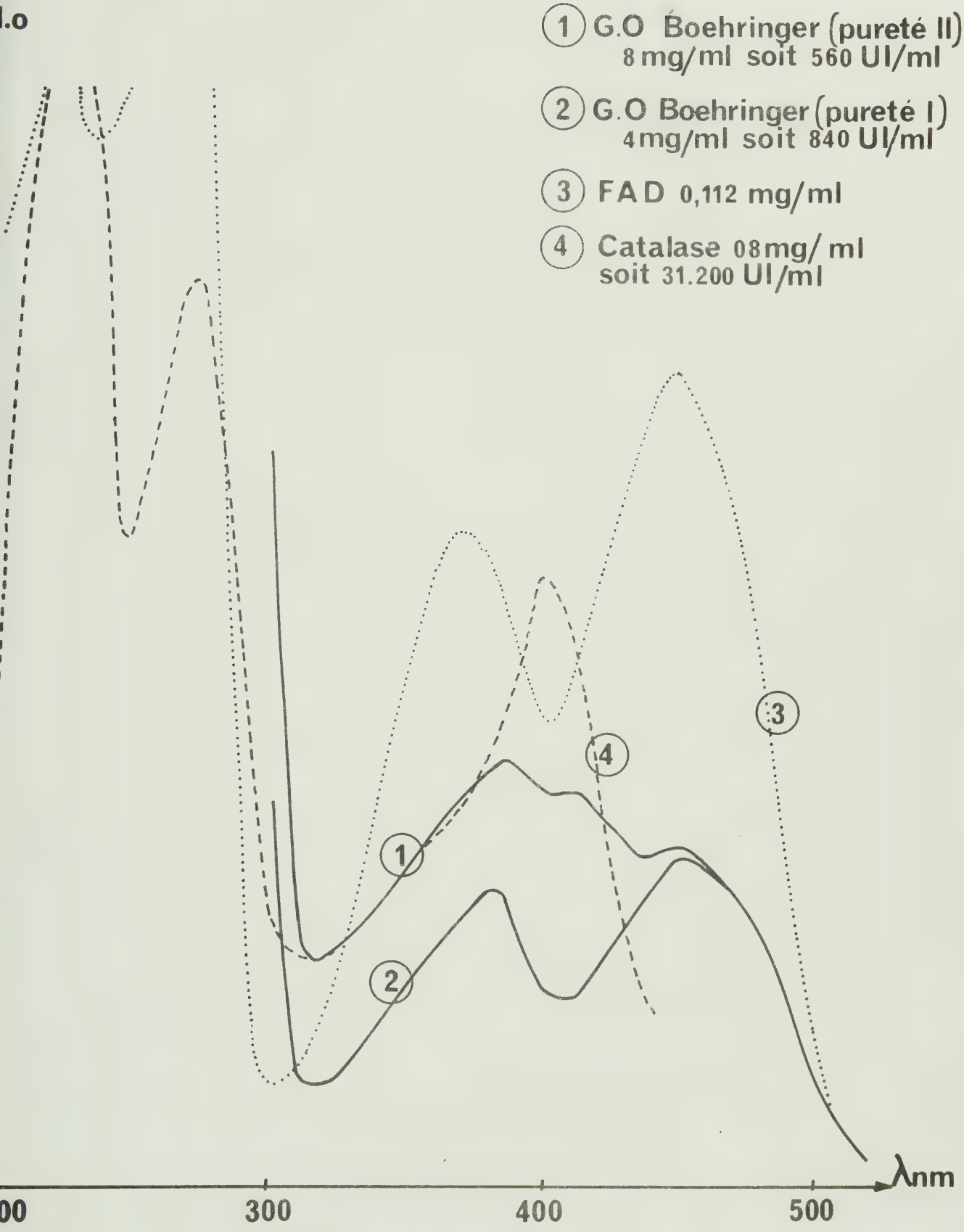

1.o
1 G.O Boehringer (pureté II)
8 mg/ml soit 560 UI/ml
2 G.O Boehringer (pureté I)
4mg/ml soit 840 UI/ml
3 FAD 0,112 mg/ml
4 Catalase 08mg/ml
soit 31.200 UI/ml
1
2
3
4
00
300
400
500
λnm

Fig A II . 6

l'enzyme.

AII - 3.2. Etude de la phosphatase acide.

Pour déterminer les constantes caractéristiques de la phosphatase acide, nous avons utilisé comme substrat le p. nitrophényl phosphate qui, après hydrolyse enzymatique conduit au p.nitrophénol de coloration jaune ; la densité optique de cette solution mesurée à 400nm est sensiblement proportionnelle à la concentration en p.nitrophénol formé (figure AII. 7).

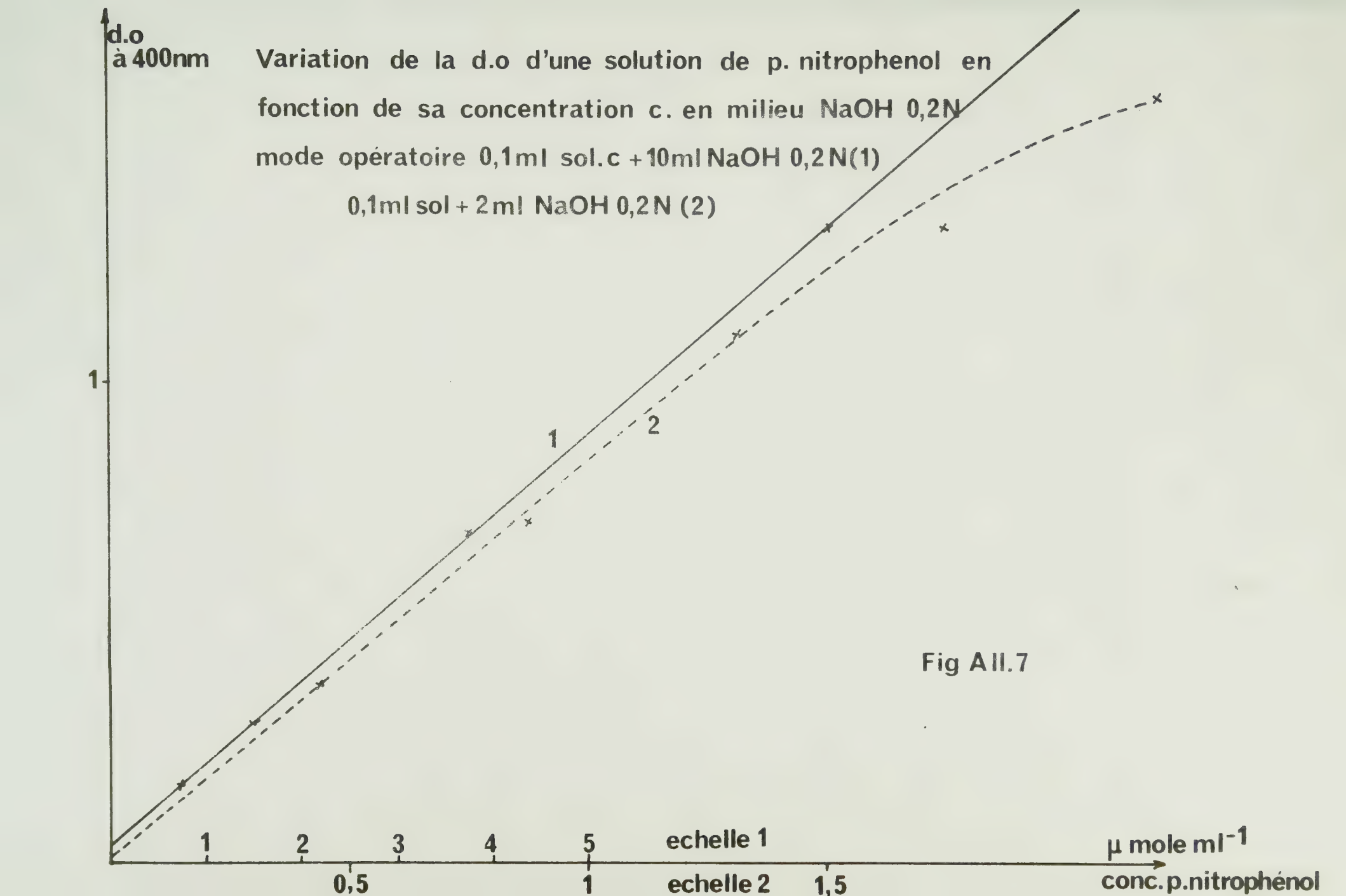

d.o
à 400nm
Variation de la d.o d'une solution de p. nitrophenol en fonction de sa concentration c. en milieu NaOH 0,2N
mode opératoire 0,1ml sol.c +10ml NaOH 0,2N(1)
0,1ml sol + 2ml NaOH 0,2N (2)
1
1
2
1
2
3
4
5
echelle 1
µ mole ml-1
0,5
1
echelle 2
1,5
conc.p.nitrophénol

Fig A II.7

BIBIOGRAPHIE

- BAILLIE M.J. et BROWN D.H. J. Chem. Soc. 1961, 3691.
- BERGMEYER Méthods of enzymatic analysis, 971.
- BROWN D.H. ; LELLAN A.W. ; J. Chem. Soc. (A) 1968, 346.
- CADIOT M. ; SOUCHAY P. C.R. Acad. Sc. 1966, 263, 927.
- CHALMERS R.A. ; SINCLAIR A.G. J. Inorg. Nucl. Chem. 1967, 29, 2065.
- CLARK E.R. J. Inorg. Nucl. Chem. 1962, 24, 1381.
- COURTOISIER A.J. ; RIBEREAU GAYON J. Bull. Soc. Chim. 1963, 2, 352.
- DARMOIS E. a). Bul. Soc. Chim. 1926, 39, 621.
  b). " " " " " 723.
  c). " " " " " 1515.
- JACOBSOHN K. ; DEODATA AZEVEDO M. Química 1965 VII 1.
- KOLLI I.D. ; PEREKALINA Z.B. Zh. Neorg. Khim. 1968, 13 (3), 742.
- KRISHNAIAH K.S.R. Proc. Indian Acad. Sci. sect. A, 1968, 67 (4), 222.
- PORAIKOSHITS M.A. et al. Zh. Strukt. Khim. 1968, 9 (3), 475.
- PYATNITSKII I.V. ; KRAVTSOVA L.F. Ukr. Khim. Zh. 1968, 34 (3), 231.
- SWOBODA B.E.P. ; MASSEY V. J. of Biol. Chem. 1965, 240 (5), 2209.

A N N E X E III

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

III. 1. INTRODUCTION.

Devant le peu de succès des essais de séparation sur résine asymétrique présentés au chapitre I, nous avons été amenés à rechercher les raisons des échecs enregistrés aussi bien par nous-mêmes que par de nombreux autres chercheurs et il nous a, pour cela, paru indispensable d'entreprendre une étude bibiographique critique de l'ensemble des méthodes d'obtention d'énantiomères purs mises en oeuvre.

Deux grandes voies d'expérimentation peuvent être suivies lorsqu'on veut résoudre ce problème :

1). Synthèse directe du composé.

2). Séparation des énantiomères à partir du racémique.

La synthèse directe d'un isomère optique donné peut être envisagée soit à partir d'un corps renfermant déjà le centre d'asymétrie dont il faudra conserver les propriétés au cours de la réaction, soit par création de l'asymétrie, possible en utilisant un intermédiaire chiral lors de la réaction. Ce dernier processus est celui qui s'établit in vivo, les organismes vivants étant capables de synthétiser exclusivement un énantiomère d'un composé donné, tels par exemple les L aminoacides ou les D hexoses, en présence d'enzymes qui sont des catalyseurs très stéréospécifiques. Ces enzymes de structure protéique, contiennent de nombreux centres d'asymétrie au niveau desquels se fait certainement l'orientation stéréospécifique lors de la formation du complexe enzyme substrat., la réaction chimique fait intervenir ce complexe donc un composé présentant l'asymétrie.

Ce genre de synthèses est extrêmement difficile à réaliser in-vitro et les expériences effectuées aboutissent presque toujours à des résultats médiocres comme l'indique A. Amariglio lors d'une analyse de ce problème appuyée sur de nombreux exemples ; nous ne développerons donc pas davantage ce premier point.

Nous allons, par contre, dans ce chapitre, voir avec quelques détails les différentes méthodes utilisées pour les résolutions de racémiques et essayer d'en déduire quels sont les critères qui peuvent à priori donner l'espoir d'obtenir une telle séparation.

Tous les procédés expérimentaux mis en oeuvre font appel soit à la cristallisation à partir de solutions saturées, soit à la chromatographie sous ses diverses formes, sur papier, en phase liquide ou en phase gazeuse, sur colonne de résine, et permettent de distinguer entre méthodes indirectes et directes suivant qu'ils passent ou non par l'intermédiaire des sels diastéréoisomères du racémique à résoudre et d'un énantiomère pur d'un autre corps. Les résultats obtenus sont toujours meilleurs lorsqu'on passe par l'intermédiaire de sels diastéréoisomères. On sait en effet que deux énantiomères ne présentent aucune différence de propriétés physiques et chimiques en dehors de leur action sur la lumière polarisée, il n'en est pas de même lorsqu'on compare les différents diastéréoisomères d'un même composé chimique (renfermant au moins deux centres d'asymétrie qui sont le plus souvent des atomes de carbone) et ces variations de propriétés physiques pourront être exploitées à des fins séparatives.

Si le racémique DLX à résoudre est susceptible de réagir avec un énantiomère pur d'un second composé, LY par exemple, à centre d'asymétrie, on obtiendra deux diastéréoisomères, DX, LY et LX, LY, plus faciles à séparer que les inverses optiques de départ ; ces derniers seront régénérés après résolution du mélange diastéréoisomère. Les opérations seront évidemment longues puisque en dehors de la séparation elle-même, elles font intervenir deux réactions chimiques.

Un tel procédé est généralement utilisé lorsque le racémique possède des propriétés acido-basiques ; par exemple, un acide DLA réagira avec une base DB pour donner un mélange de deux sels DA-DB et LA-DB qui seront séparés par l'une des méthodes que nous allons voir. Il suffira ensuite de régénérer LA et DA par hydrolyse des sels correspondants ; dans ce cas deux réactions simples, faciles à mettre en oeuvre permettront de bénéficier des possibilités de séparation offertes par les diastéréoisomères.

Les possibilités de formation stéréospécifique d'un complexe enzyme-substrat ou enzyme inhibiteur ne sont jamais exploitées directement à des fins séparatives comme nous avons tenté de le faire ici. Toutefois certains chercheurs font intervenir les enzymes, préalablement à la séparation, pour tranformer sélectivement un seul antipode du racémique en produit (Minoru Hiramoto ; Schmitt et al ; Shiro Kudo et al ; Yamada Hiromi et al). Ils se trouvent alors en présence d'un mélange de deux composés chimiques différents qu'il devient facile de séparer par une méthode quelconque, chromatographie ou cristallisation le plus souvent. Cette méthode enzymatique aboutissant finalement à une méthode de séparation chimique classique, nous n'en tiendrons pas compte dans le développement qui va suivre.

III - 2. Méthodes de séparation.

III - 2.1. Cristallisation.

La méthode de résolution d'un racémique la plus ancienne consiste en une séparation manuelle des cristaux obtenus à partir d'une solution saturée. Il est en effet assez rare qu'un composé racémique solide cristallise à partir de la solution. On obtient généralement un mélange de cristaux formés soit exclusivement de l'un ou l'autre des énantiomères, soit d'un mélange des deux mais en quantité non équivalente. L'asymétrie se traduit par une différence dans la géométrie du cristal et un triage manuel permet d'isoler les cristaux de même configuration. C'est ainsi que Pasteur, dans son expérience

fondamentale, a pu obtenir des cristaux actifs de malate acide d'ammonium. Il est bien évident qu'une telle méthode de séparation présente surtout un intérêt historique mais elle peut dans certains cas être utile pour apporter la preuve d'une possibilité de dédoublement (Vogler et al.).

De plus il est possible d'utiliser la recristallisation à des fins séparatives en l'amorçant par un germe optiquement actif - qui peut même être chimiquement différent du produit à séparer. Il y a alors orientation de la cristallisation à condition que le racémique à résoudre ne soit pas un composé mais un mélange de deux énantiomères, ce dont on peut s'assurer par une comparaison des spectres I.R. des différents solides correspondants : le spectre I.R. d'un composé racémique est en effet généralement différent des spectres, identiques, obtenus à partir de l'un ou l'autre des antipodes (Koegel et al.).

Cette méthode a été appliquée à la résolution d'aminoacides. C'est ainsi, pour ne donner que quelques exemples assez récents, que Gentaro Noyori et al. obtiennent 1 mole de chlorhydrate d'acide L glutamique à 97% de pureté optique à partir d'une solution sursaturée contenant 3 moles de racémique et 0,5 mole de forme L. Une autre équipe japonaise (Yamada Shigeki et al.) effectue la résolution de divers acides aminés en passant par l'intermédiaire de leurs arylsulfonates et obtient des échantillons de pureté optique variant de 92 à 100% : 10 cristallisations successives à partir de m-xylène sulfonate de DL sérine permettent d'obtenir des fractions alternativement D ou L de pureté optique variant de 96 à 100%. Le rendement global est de l'ordre de 50% soit nettement meilleur que dans l'exemple précédent mais la méthode est fort longue puisque la cristallisation doit être précédée d'une préparation de l'arylsulfonate à partir de l'amino acide et suivie d'une récupération de ce dernier.

Cherchant à établir une relation entre la constitution du racémique et la possibilité de résolution par cristallisation, Teiko Watanabe et al. concluent que la solubilité du racémique doit être

inférieure à celle d'un énantiomère pour qu'un cristal d'une forme optiquement active placé dans une solution sursaturée de racémique provoque la cristallisation d'un seul stéréoisomère ; compte tenu de la relation :

$$\text{Log } S_{sat.} = - \frac{\Delta G_{\circ\ diss.}}{RT}$$

existant entre la solubilité maximale d'un soluté et son enthalpie libre de dissolution, on en déduit que la cristallisation amorçée par un germe sera stéréosélective si les enthalpies libres de dissolution du soluté et du racémique sont telles que :

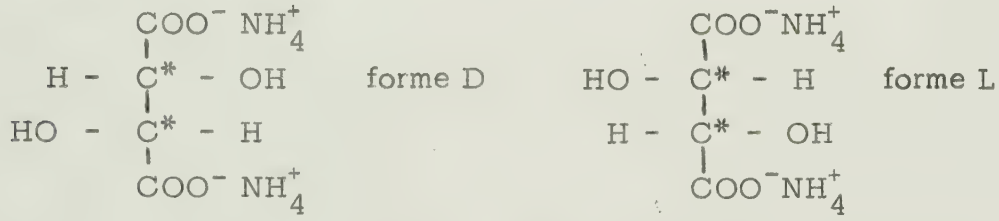
$$\Delta G_{\circ\ dis.\ Rac} > \Delta G_{\circ\ dis.\ énant.}$$

Cette relation paraît assez improbable dans le cas où le racémique est un mélange des deux énantiomères. En effet, la cristallisation représente le passage de l'état désorganisé du soluté dans la solution à l'état organisé du solide sans aucune modification des liaisons fortes, c'est à dire de l'enthalpie ; il y aura par contre création de faibles liens intermoléculaires, l'énergie ainsi introduite étant d'origine entropique.

En l'absence de germe, l'un ou l'autre des inverses optiques cristallisera indifféremment, aucune différence d'entropie de dissolution n'étant mise en évidence, ce qu'a démontré R. Creek en effectuant des déterminations de solubilités de couples d'énantiomères pour différents aminoacides. Par contre, en présence d'un germe optiquement actif, on conçoit que l'énergie de cristallisation soit différente suivant que le réseau cristallin de l'énantiomère considéré correspond ou non à celui du germe. Une différence dans les entropies de cristallisation apparaîtra alors et c'est évidemment le mode de cristallisation permettant d'atteindre le plus bas niveau d'énergie qui se produira préférentiellement.

Si l'on passe à l'étude d'un composé renfermant deux carbones asymétriques, tel le tartrate d'ammonium racémique, il est possible de mettre en évidence une différence entre les chaleurs de dissolution

dans l'eau des deux antipodes (+) et (-) (Thiemann et al.), ce qui se traduit, lors de la dissolution du racémique, par l'existence d'un faible pouvoir rotatoire ($\alpha = 10^{-3}°$) de la solution obtenue. Il y a donc alors une différence entre les enthalpies libres de dissolution des deux inverses optiques qui est mesurable mais reste trop faible pour pouvoir être exploitée à des fins séparatives. Les molécules considérées dans cet exemple représentent toutefois un cas particulier de diastéréoisomères érythro, les deux carbones asymétriques portant les trois mêmes substituants.



Lorsqu'il n'y aura plus une telle similitude des substituants, c'est à dire dans le cas le plus général de diastéréoisomérie, les solubilités comparées des divers diastéréoisomères seront nettement différentes et il deviendra possible de mettre au point une séparation de deux inverses optiques par cristallisation fractionnée. C'est une méthode utilisée depuis de nombreuses années à des fins séparatives et, de ce fait, la plus généralement indiquée (Cram et Hammond). De très nombreux exemples de son utilisation peuvent être fournis parmi lesquels nous citerons quelques préparations de composés utilisés dans ce travail ou effectuées au laboratoire.

A partir de DL α phényl éthyl amine, on obtient l'isomère D pur avec un rendement de 60% par cristallisation du D amine L malate puis l'isomère L par cristallisation du L amine D tartrate (Ingersoll). On peut isoler un D amino-acide, la D histidine par exemple, en formant la D histidine - D tartrate acide qui précipite d'une solution aqueuse (Bosch). Inversement les acides racémiques sont généralement dédoublés en passant par l'intermédiaire de leurs sels avec une base active ; ainsi M. Vert a isolé, au laboratoire, les acides D p. hydroxy-

benzylsuccinique et D méthyl 2 p. hydroxyphénylsuccinique avec un rendement légèrement supérieur à 50% en utilisant les diastéréoisomères formés par ces acides avec la L. brucine ; D tartrate pour les amines et L brucine pour les acides sont d'ailleurs les deux agents de résolution par cristallisation les plus fréquemment utilisés. Ils permettent d'obtenir des énantiomères de bonne pureté optique mais avec un rendement médiocre (tableau III. 1).

En conclusion, il n'y aura de séparation possible de deux inverses optiques par cristallisation que si la différence entre les deux enthalpies libres de dissolution est suffisamment grande, ce qui implique généralement la présence d'au moins deux centres d'asymétrie dans la molécule. Ce n'est qu'à cette condition qu'on peut admettre que l'un des énantiomères aura, par suite des différences de configuration, une plus grande aptitude que l'autre à former de faibles liaisons intermoléculaires caractéristiques de la cristallisation.

III - 2.2. Fractionnement chromatographique.

En exploitant, comme ci-dessus, la différence de solubilité qui existe entre deux diastéréoisomères inverses optiques, Gonci et Purdy ont pu fractionner avec succès deux paires d'énantiomères : les D mandélate de D et L α phényl éthylamine et les D et L tartrate de L brucine qu'ils ont séparés à 60% ; le couple D tartrate de D et L histidine ne leur a permis de réaliser qu'une résolution très partielle décelable seulement en utilisant un carbone marqué pour l'un des énantiomères et les couples D et L α phényl éthylamine n'ont pu être résolus ; dans ce dernier cas, il y a sans doute cristallisation en un sel double qui explique l'échec subi. Dans leurs expériences, Gonci et Purdy reprennent une technique introduite par Baker et Williams pour

TABLEAU III - 1.

Résultats obtenus par cristallisation

Produit de départ	nature	énantiomère obtenu	rendement	pureté optique
1) Chlorydrate d'acide glutamique	racémique	L	30%	97%
2) α phényl éthyl amine - L malate	diastéréoisomère	D α φ éthyl amine	60%	pur
3) α phényl éthyl amine D tartrate	"	L "	55%	"
4) histidine - D tartrate acide	"	D histidine		
5) acide phbs - L brucine (1)	"	ac. D phbs	54%	"
6) acide 2 ph Y 2s - L brucine (2)	"	ac. D 2 ph Y 2s	52%	"
7) " "	"	ac. L "	36%	"

(1). ac. phbs : acide parahydroxy-benzyl succinique.
(2). 2 ph Y 2s : acide 2 parahydroxy phényl 2 succinique.

des séparations en continu de polymère, ce dernier étant introduit au sommet d'une colonne inerte sous forme de film sur billes de verre en présence d'un solvant pauvre ; la colonne au long de laquelle est établi un gradient de température est ensuite éluée par un mélange de pouvoir solvant croissant. Le sel le plus soluble, donc possédant l'énergie libre de dissolution la plus basse, est recueilli en premier lieu, soit le D tartrate - L histidine, le L tartrate - L brucine et le D mandélate - L amine pour les trois exemples positifs précédents. L'utilisation d'un gradient de température n'est pas indispensable mais améliore les rendements. Cette méthode présente sur la cristallisation, l'avantage de pouvoir opérer sur de faibles quantités de produits - quelques dizaines de mg - et d'être automatique mais elle reste lente.

III - 2.3. Chromatographie sur support solide.

La chromatographie étant une méthode de séparation de choix, de nombreux chercheurs ont essayé de mettre au point des méthodes de résolution de racémique par chromatographie d'abord sur des composés naturels présentant une disymétrie d'ensemble comme le quartz ou renfermant plusieurs carbones asymétriques dans leur molécule comme l'amidon, la laine ou la soie, puis ensuite sur des résines synthétiques à carbone asymétrique. Lorsqu'un substrat s se trouve en présence d'un support chromatographique S, il y a formation d'un complexe suivant la réaction :

$$s + S \underset{\text{élution}}{\overset{\text{fixation}}{\rightleftharpoons}} s - S$$

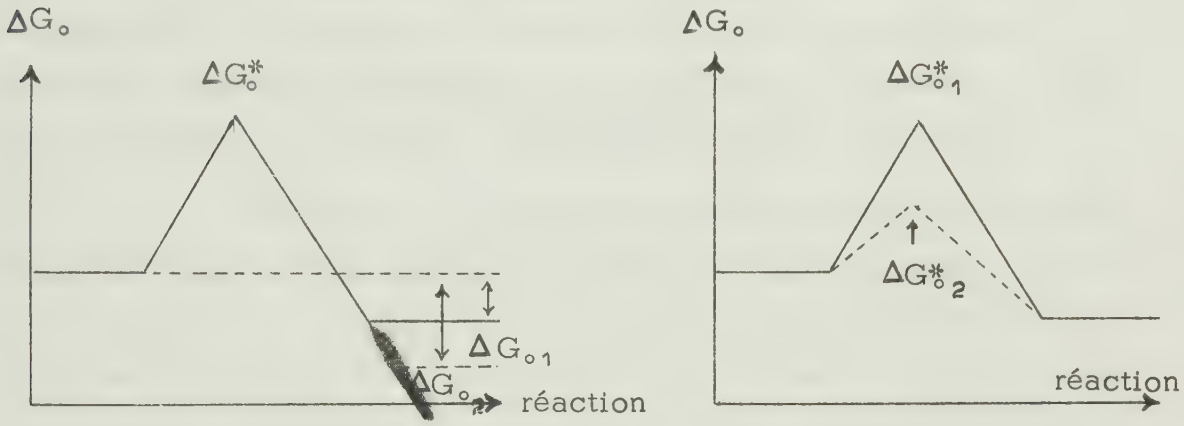
que l'on caractérise par l'enthalpie libre de formation ΔG_o du complexe.

Il est évident que, lorsque deux substrats s_1 et s_2 seront mis simultanément en présence d'un même support, il n'y aura de séparation possible que dans deux cas :

- ou bien les enthalpies libres de formation ΔG_{o1} et

ΔG_{o_2} des deux complexes seront différentes,

- ou bien les cinétiques de formation des deux complexes seront différentes, ce qui correspond à une enthalpie libre d'activation différente. Ces deux possibilités sont représentées par les profils de variation de l'enthalpie libre suivants :



Dans le prelier cas, l'examen des configurations des molécules en présence doit permettre de prévoir s'il y aura ou non possibilité de séparation. Cette dernière ne pourra être effective que dans la mesure où il existe, dans $S\text{-}s_1$ par exemple, une liaison qui ne pourra se former dans $S\text{-}s_2$ par suite d'un bloquage de structure maintenant les deux radicaux intervenant dans la liaison trop éloignés l'un de l'autre.

Dans le second cas, seule l'expérience pourra mettre en évidence une différence dans les vitesses de réaction. De plus, la technique de séparation sera plus délicate à mettre au point car, s'il y a un excès suffisant de séparateur le deuxième complexe se formera aussi, bien que plus lentement que le premier, et on n'observera finalement aucune résolution.

Nous allons reprendre ici les principaux résultats obtenus à ce jour dont certains ne sont que partiels et nous attacher à mettre en lumière les critères configurationnels qui interviennent.

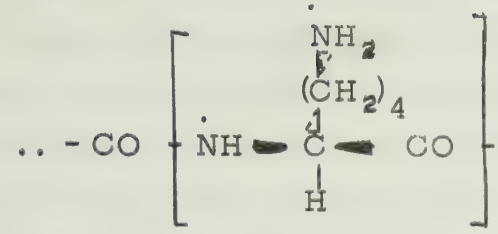
III - 2.3. 1). Chromatographie sur composés naturels.

Bien que le quartz actif ait souvent été choisi comme agent de résolution, nous ne développerons ici aucun exemple le faisant intervenir ; il semble en effet après les résultats toujours négatifs de A. AMARIGLIO (a) que les succès annoncés par divers auteurs et d'ailleurs très controversés, ne soient en réalité que des erreurs d'interprétation ou d'analyse et ne puissent être pris en considération ; la structure hélicoïdale responsable de la disymétrie d'ensemble du quartz ne doit donc pas lui permettre de différencier deux énantiomères.

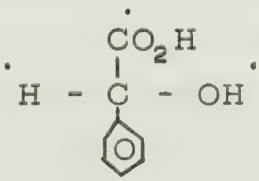
De l'analyse bibliographique due à Rogozhin et Davankov (d), il ressort que les protéines naturelles ont été les premiers absorbants asymétriques utilisés en vue d'une séparation stéréospécifique. Le premier résultat suffisamment précis est annoncé par Martin et Kuhn qui, en 1941, obtiennent des fractions de pouvoirs rotatoires -0°35 et +1° en passant de l'acide DL mandélique sur une colonne de laine ; ces expériences sont confirmées en 1950 par l'équipe de Bradley qui met l'accent sur l'importance du rôle joué par les restes L lysine et L arginine dans l'absorption stéréospécifique de l'acide DL mandélique ; en effet, lorsque ces deux aminoacides sont absents ou presque de la chaîne protéique (cas de la soie), les résultats obtenus sont négatifs, de même que lorsque leurs groupements basiques sont bloqués par un autre acide avant passage du racémique à résoudre. Bradley en déduit que la sélectivité d'une protéine naturelle vis à vis d'un racémique à fonction acide est liée à la présence de groupements basiques libres qui sont responsables de la liaison forte $-\overset{+}{N}H_3$, $-CO_2^-$. Différents essais sur d'autres acides glycolliques α substitués par un groupement alkyl ou aryl conduisent Bradley aux conclusions suivantes : plus le substituant est encombrant et moins la sélectivité est bonne ; de plus cette dernière est liée en partie à la présence du groupe carboxylique libre et d'un noyau aromatique en α du centre d'asymétrie.

En fait, si l'on examine les structures on constate qu'il existe 3 possibilités de liaisons pour le substrat s comme pour le

support S :



maillon L lysine



ac. D mandélique

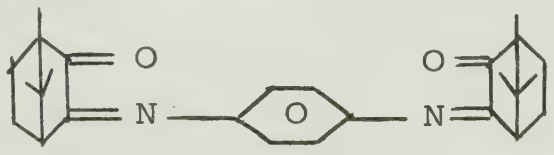
En effet, un maillon lysine offre une possibilité de liaison forte (base libre) et deux de liaisons faibles sur chaque lien peptidique par suite de la mésomérie :

Une molécule d'acide mandélique possède une fonction acide (liaison forte possible), un hydroxyle polarisé et un hydrogène rendu suffisamment mobile par la présence de substituants attracteurs d'électrons sur le carbone porteur. Comme les deux liens peptidiques existent au niveau de chaque amino-acide, il apparaît donc que la sélectivité est déterminée par la possibilité d'une troisième liaison S-s ; ceci s'explique aisément en admettant que lorsque la liaison forte acide-base et une des liaisons hydrogène seront formées, il y aura bloquage partiel des deux molécules en présence et la troisième liaison ne pourra s'établir que si les radicaux susceptibles de la former sont assez proches l'un de l'autre, ce qui ne se produira que pour l'un des énantiomères qui sera fixé préférentiellement et plus solidement. En ce qui concerne la structure du racémique à séparer il faudra que, dans le cas considéré ici, la fonction acide ne soit pas bloquée puisqu'elle intervient dans la liaison forte et que le quatrième substituant du C* n'ait pas sur les électrons un effet répulsif qui compenserait l'effet électro-attracteur de - CO_2H et - OH et diminuerait la mobilité de l'hydrogène, critère auquel répond le noyau aromatique.

Des essais de résolution sur caséine, faisant apparaître une absorption préférentielle d'acide L (+) mandélique, aboutissent à des résultats négatifs pour l'acide α bromopropionique $CH_3 - CHBr - CO_2H$ dans lequel l'hydrogène n'est pas suffisamment positif pour intervenir dans une liaison. On remarque au niveau de ces expériences que c'est toujours la forme dextrogyre (soit L (+) dans le cas de l'acide mandélique) qui est fixée préférentiellement, ce qui n'apporte rien du point de vue théorique, le signe du pouvoir rotatoire n'étant nullement relié sustématiquement à la configuration absolue du carbone asymétrique.

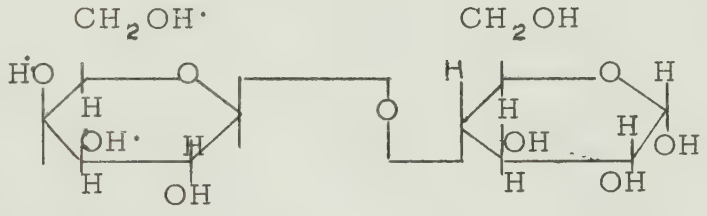
Bien qu'ayant permis d'obtenir des résultats encourageants - l'excès d'isomère dextrogyre combiné par rapport au lévogyre étant de 3,5% à l'équilibre pour l'acide mandélique - la laine n'a jamais été utilisée en colonne en raison de la cinétique très lente des échanges, du mauvais tassage de cette matière première et de l'incertitude concernant sa pureté dans la reproductibilité des essais.

Les glucides naturels (amidon et cellulose surtout mais aussi lactose etc...) ont été très utilisés à des fins de séparations stéréospécifiques. Contrairement aux acides aminés intervenant dans les exemples précédents, ils ne contiennent aucun groupement présentant une activité acido-basique en milieu aqueux et une résolution éventuelle de racémate sera due uniquement à des différences dans l'établissement de liaisons intermoléculaires faibles - essentiellement ponts hydrogène - entre les hydroxyles des glucides et certains groupements du composé étudié. Le premier essai de résolution chromatographique d'un composé à C asymétrique est dû à Henderson et Rule (a, b) qui, dès 1938 résolvent totalement le DL p. phényl bisiminocamphre sur (+) lactose :



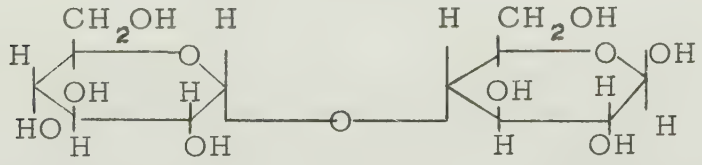
par la méthode chromatographique de Tswett ; ils obtiennent l'isomère

lévogyre pur après quatre cycles, chacun permettant de récupérer 10% du produit de départ, ce qui représente un rendement final très faible de 2‰ ; le solvant utilisé est une fraction de pétrole léger contenant 12 à 25% de benzène. De nombreuses autres expériences ont été menées à bien sur lactose comme le démontrent les études bibliographiques de Th. Vermeulen et de Davankov (d), tels par exemple les travaux de Garmaise et Colucci (a, b) sur divers acides aminés à chaîne latérale acide ou basique et dérivés dont la lysine, ses esters méthylique et dichlorhydrate, la proline, le tryptophane, l'acide glutamique, qui tous possèdent trois groupements susceptibles d'intervenir dans des liaisons hydrogène, dont deux sont liés directement au centre d'asymétrie, le troisième pouvant en être plus éloigné. Le saccharose et le maltose qui présentent une grande analogie de constitution avec le lactose ne peuvent que rarement le remplacer avec efficacité, ce qui met en évidence l'importance de la configuration spatiale des molécules. La comparaison des formules de ces trois oligosaccharides montre que seul le lactose possède trois groupements hydroxyles (sur les C3, 4 et 6), très voisins les uns des autres, ce qui peut expliquer son pouvoir séparateur accru



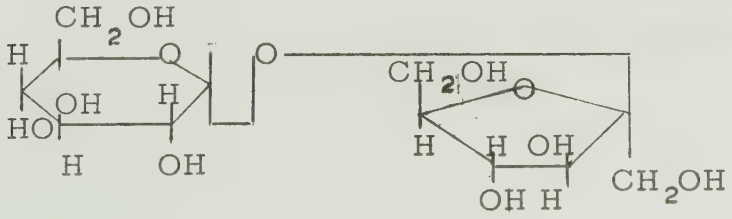
β D galactose — α D glucose

α lactose



α D glucopyrannose — β D glucopyrannose

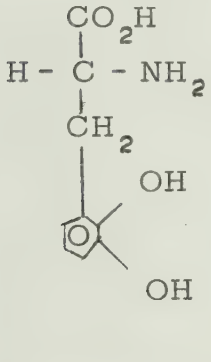
maltose



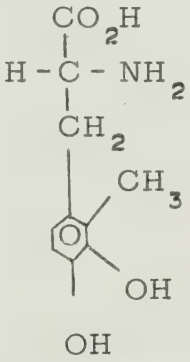
α D glucopyrannose — β D fructofurannose

saccharose

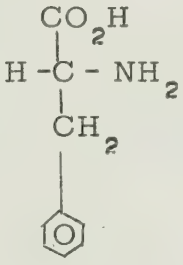
La cellulose (poly β glucopyrannose) pour laquelle la position relative des groupes hydroxyles est la même que dans le lactose, ne permet d'aboutir à aucune séparation efficace en colonne. Elle a, par contre été très largement utilisée et avec succès lors de séparations de racémates par chromatographie sur papier. Il semble donc que la position relative plus ou moins favorable des hydroxyles ne soit pas seule en cause et qu'il faille expliquer partiellement les échecs enregistrés par un engagement de ces hydroxyles dans des liaisons hydrogène avec le solvant qui pénètre facilement dans le polyholoside très poreux constituant la colonne ; Dent, dès 1948, résout les acides aspartique et glutamique mais il faut attendre Dalgliesh (a, b, c) pour trouver une étude systématique de telles résolutions ; il établit que la chromatographie sur papier fait intervenir des phénomènes d'adsorption dans lesquels les liaisons d'hydrogène jouent un rôle important. Ainsi, parmi les dérivés suivants de la phényl alanine, seuls les deux premiers sont résolus et ne le sont plus si on acétyle la fonction amine.



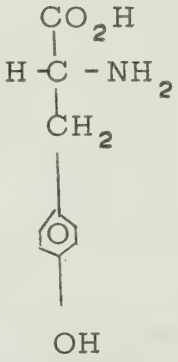
2,3 diol



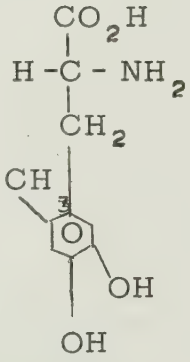
2 méthyl, 3-4 diol



phényl-alanine



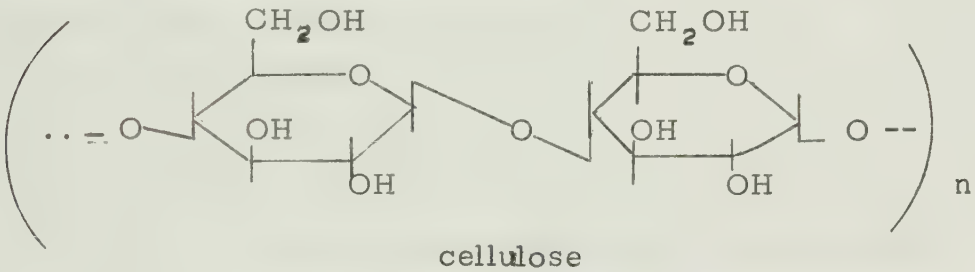
tyrosine



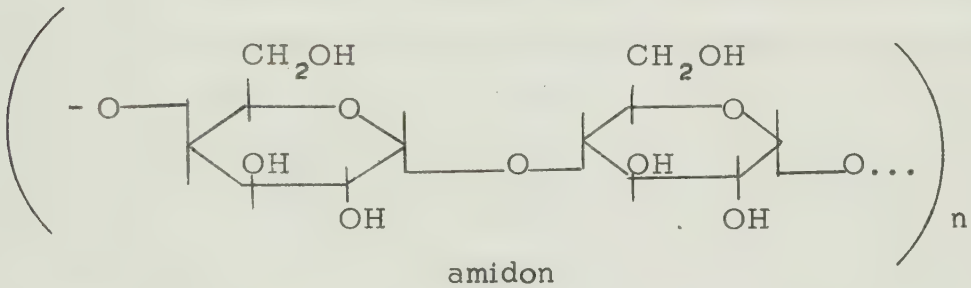
6 méthyl, 3-4 diol (ou 3-4 diol seul)

Dalgliesh en conclut qu'une des conditions nécessaire à la résolution d'un α aminoacide est que sa molécule contienne des fonctions amine et carboxyle libres donc disponibles pour former des liaisons avec les OH de la phase stationnaire ; poursuivant son analyse sur d'autres corps, Dalgliesh déduit finalement que, pour qu'il y ait

séparation, il faut qu'une troisième liaison soit possible : il établit ainsi la règle des trois points de contact qui s'applique parfaitement aux exemples précédents. Cette règle a été discutée par Krebs lors d'essais de séparation de toute une série de composés sur colonne d'amidon ; le processus de séparation qui s'établit dans les cas de la cellulose et de l'amidon est sûrement le même puisqu'ils sont l'un et l'autre formés de chaînons glucosidiques liés en β 1-4 pour le premier et en α 1-4 pour le second ; la position des trois hydroxyles libres (2,3 et 6) est la même.

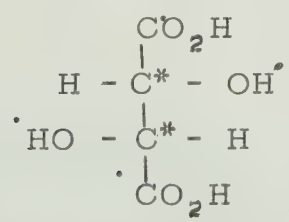


cellulose

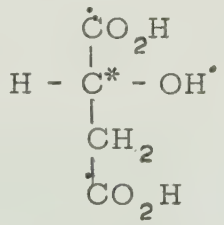


amidon

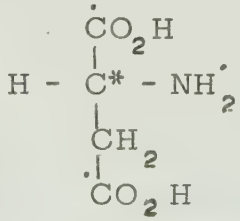
Les acides tartrique, malique (pureté optique 8%) et aspartique (pureté optique 13%) racémiques pour lesquels trois liaisons peuvent s'établir, au niveau des groupes carboxyle, amine et alcool, sont résolus plus ou moins complètement alors que les essais sur alanine, phénylalanine, méthionine, isoleucine et tryptophane, qui ne possèdent que deux possibilités de liaisons avec l'amidon conduisent à des échecs totaux, ce qui est en accord avec la règle ci-dessus.



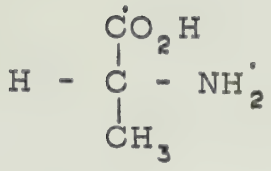
acides D tartrique



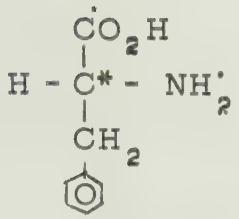
D malique



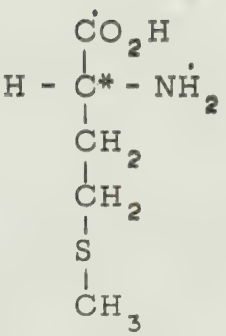
D aspartique



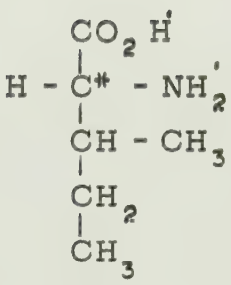
D alanine



D phényl alanine

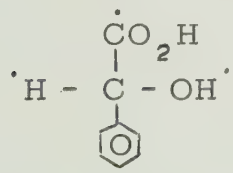


D méthionine

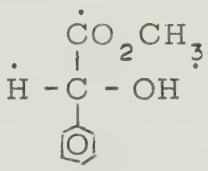


D isoleucine

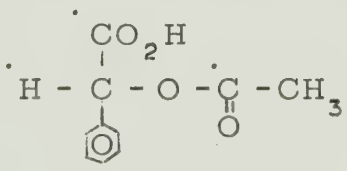
Par contre, Krebs déduit de résultats obtenus avec l'acide mandélique (pureté optique 64,5%), ses dérivés O-alkylés ou O-acylés et avec la phényl glycine (pureté optique 42,5%) que cette règle s'applique exclusivement aux composés aliphatiques(la mobilité autour des liaisons C-C conférant une certaine flexibilité à la chaîne) et que, dans le cas de composés aromatiques, deux ou même un seul groupe capable de se lier à l'amidon suffit pour obtenir une résolution, la rigidité de la chaîne étant la condition déterminante de la résolution. Il semble que cette conclusion ne soit pas justifiée et qu'il y ait trois points de contact possibles pour la phénylglycine comme pour l'acide mandélique et ses dérivés, le troisième contact s'établissant au niveau de l'hydrogène lié au C asymétrique, comme nous l'avons déjà vu ci-dessus. O'Hara et son équipe démontrent que ce sont toujours les isomères D de l'acide mandélique et dérivés qui se fixent le moins bien sur l'amidon, exception faite de l'acide atrolactique pour lequel la forme L est éluée en premier, ce qui les amène à mettre en doute la configuration admise pour chaque antipode de ce dernier acide. Or si l'on compare les formules de ces divers composés (Amariglio (a)) :



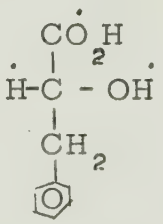
ac. D mandélique



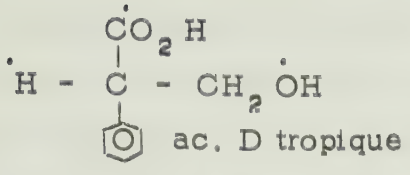
D mandélate de méthyle



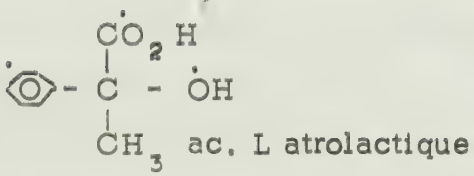
ac. D acétyl mandélique



ac. Dβ phényl lactique



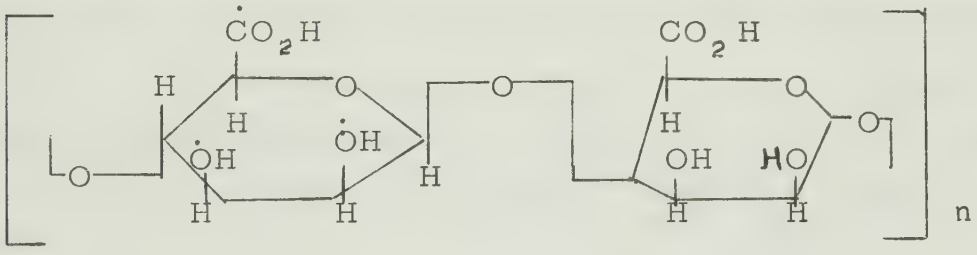
ac. D tropique



ac. L atrolactique

on voit que la position relative des trois groupes pouvant intervenir dans des liaisons hydrogène est la même. Pour la dernière molécule, la troisième liaison, si elle exoste, ne peut s'établir qu'au niveau du noyau aromatique, le radical méthyle étant particulièrement peu réactif.

L'influence du nombre de liaisons intervenant entre support et substrat est encore illustrée par une série d'expériences dues à Ch. Kratchanov et M. Popova. Ces auteurs utilisent des acides polyuroniques, les acides polygalacturonique et alginique pour résoudre des amines diastéréoisomères les (±) threo et (±) érythro α β diphényl β alanine et la (±) thréoritaline ; ils étudient l'influence du gonflement c'est à dire de la solvatation de l'acide alginique sur la résolution des racémiques et mettent en évidence l'existence d'un degré de gonflement optimum ; ceci peut s'expliquer par la conjugaison de deux effets : lorsque le gonflement augmente l'acide alginique :



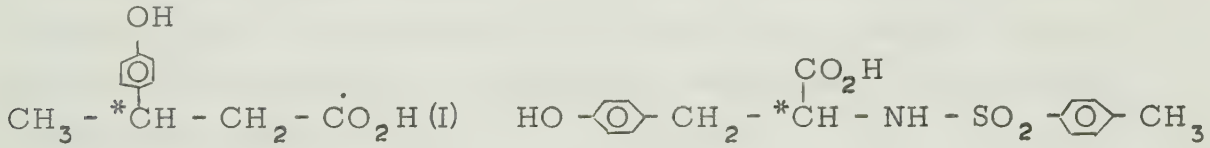
manifeste mieux son asymétrie mais dès que des hydroxyles s'engagent dans des liaisons H avec le solvant ils ne peuvent plus réagir avec le substrat ; il ne reste plus alors que deux ou même une seule possibilité de liaison support-substrat et il n'y a plus de séparation possible.

Donc, pour l'ensemble des composés naturels utilisés comme agent de résolution d'énantiomères, la présence dans la molécule support comme dans la molécule racémique de trois radicaux assez proches du centre d'asymétrie pouvant donner naissance à trois liaisons, apparaît comme un critère d'efficacité. Deux liaisons s'établiront avec

la même facilité pour les deux énantiomères réduisant considérablement les possibilités de rotation d'une molécule par rapport à l'autre ; on comprend alors que, suivant la configuration de l'énantiomère, la troisième liaison s'établisse avec plus ou moins de facilité et nécessite un apport d'énergie plus ou moins grand ; les complexes formés auront en conséquence une stabilité différente. On remarque qu'un atome d'hydrogène porté par le C asymétrique peut intervenir dans cette troisième liaison s'il est suffisamment polarisé positivement c'est à dire si les autres substituants du même C sont électrophiles. Ceci explique en partie que la présence d'un noyau aromatique lié au centre d'asymétrie soit un facteur favorable à la séparation mais son effet inducteur étant faible, l'induction n'est déjà plus suffisante si ce noyau est en α du C asymétrique ; d'autre part le nuage électronique π peut intervenir directement dans cette troisième liaison.

III - 2.3. 2). Chromatographie sur résine synthétique. Les absorbants naturels ayant le plus souvent une faible capacité et le contrôle de l'homogénéité de structure étant difficile, il semble à priori que l'on doive obtenir de meilleurs résultats à l'aide d'échangeurs asymétriques synthétiques de structure mieux déterminée.

Dès 1952 Bunnet et Marks préparent des résines asymétriques par polycondensation du formaldéhyde, soit avec l'acide (+) β hydroxybutyrique (I) soit avec la N toluène p. sulfonyl L tyrosine (II).

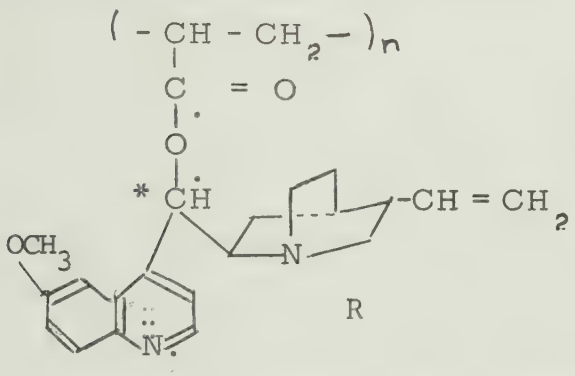


(II)

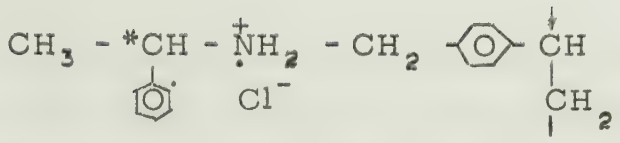
mais toutes leurs tentatives de résolution d'amines racémiques sur ces matériaux échouent ; il semble que les possibilités de faibles liaisons support-substrat soient limitées à 1 ou 2, ce qui expliquerait qu'il ne puisse y avoir de différence entre les enthalpies libres de formation des

deux complexes S-s_L et S-s_D, d'où l'échec constaté.

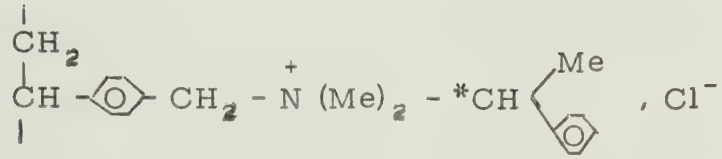
Grubhofer et Schleith arrivent à séparer les antipodes de l'acide mandélique sur un échangeur d'ions synthétisé à partir d'acide polyacrylique (Amberlite XE 64) transformé en chlorure d'acide puis estérifié par les fonctions alcool secondaire de la quinine ; la pureté optique varie en raison inverse du rendement, des fractions de 4 à 43 micromoles d'acides étant obtenues avec une pureté optique variant de 100 à 30% ; les résultats positifs sont obtenus seulement en milieu chloroforme non dissociant ; ils sont confirmés par Krebs puis par Klabunovski et al. ; ce dernier démontre en outre qu'il suffit de remplacer le substituant - OCH_3 de la quinine par H pour qu'il n'y ait plus de résolution par suite vraisemblablement d'une modification dans la répartition du nuage électronique π qui s'accompagnera d'une mobilité affaiblie de l'hydrogène lié au C asymétrique. Par contre en fixant la quinine sur un autre type de résine (résine sulfonée de fabrication russe : KMG) ; Klabunovski obtient une adsorption largement préférentielle d'acide L (+) mandélique, résultat qui démontre que la matrice de la résine n'intervient pas dans la sélectivité. Un certain nombre d'autres succès sont ensuite mentionnés qui ont fait l'objet d'études bibliographiques détaillées par S.V. Rogozhin et V.A. Davankov (d) et par Th. Vermeulen dont nous rappellerons ici les principales conclusions en y apportant quelques précisions :



1). Certains résultats annoncés positifs n'ont jamais pû être reproduits. C'est ainsi qu'en 1959, Tsuboyama et Yanagita obtiennent une fraction d'acide L (+) mandélique pur grâce à un copolymère styrène DVB chlorométhylé et aminé à la (-) α phényl éthylamine :



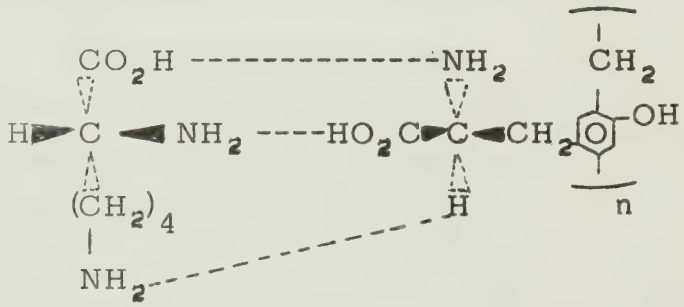
Ce résultat qui n'a pu être retrouvé ni par Rogozhin et Davankov, ni par Lott et Rieman est sûrement erroné, ce qui s'explique par la structure de l'amine choisie au niveau de laquelle il n'y aura sûrement pas de possibilité de création de trois liaisons. Par contre Lott et Rieman résolvent très partiellement l'acide mandélique (pureté optique 2 à 3%) si l'amine fixée est la L (-) NN diméthyl α phényl éthyl amine



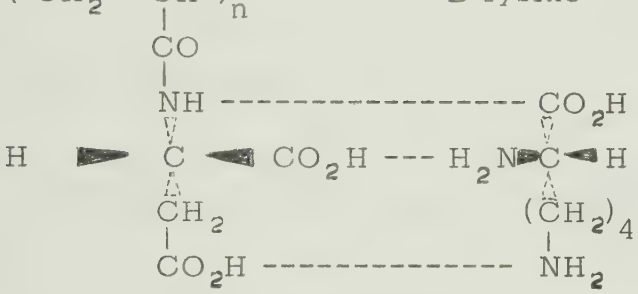
c'est à dire si la densité électronique et l'encombrement autour de l'azote sont renforcés ; il ne semble pas que le nombre de liaisons possibles soit plus grand que précédemment, par contre le degré de liberté d'une molécule (S) par rapport à l'autre (s) sera sûrement plus faible.

2). Tous les résultats indiscutablement positifs obtenus concernent soit l'acide mandélique, soit des acides aminés acides ou basiques, qui tous possèdent trois groupements, dont deux liés au carbone asymétrique, pouvant intervenir dans des liaisons de différentes sortes : l'acide mandélique a été résolu sur des résines de matrice variable mais sur laquelle est toujours fixée une amine à centre d'asymétrie : brucine (Suda et al.) éphédrine (Trochimozuk) etc... Les antipodes d'amino-acides peuvent être séparés sur des résines renfermant un acide aminé basique ou acide tel que la L tyrosine (polycondensat L tyrosine formaldéhyde obtenu en présence de resorcinol, m toluidine ou acide chromotropique) ou les acides L glutamique ou L aspartique fixés sur une chaîne polyacrylique. Dans le premier cas on obtient l'isomère L avec une pureté optique de 20 à 50%

(ornithine, lysine, acides aspartique et glutamique) donne une association L D plus stable ; dans le second cas on obtient l'énantiomère D avec une pureté optique de 17% (lysine) donc un complexe L-L plus stable. L'exemple de la lysine, présenté ci-dessous, met bien en évidence qu'un seul des deux énantiomères - précisément celui correspondant dans chaque cas au complexe le plus stable - est susceptible de donner trois liaisons avec le polymère.

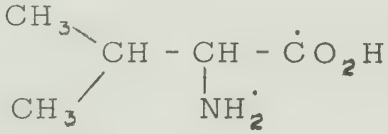


$(-CH_2-CH-)_n$ D lysine polymère L tyrosine



polymère L aspartique L lysine

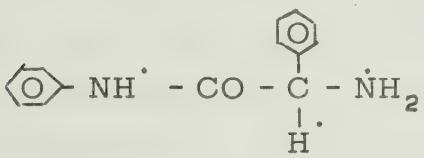
Les expériences récentes de résolution sont conformes aux conclusions précédentes ; Yamashita et Nakamura utilisent des polymères acryliques sur lesquels sont fixés des acides aminés : L phénylalanine, L tryptophane et L valine ; on remarque que seuls les deux premiers permettent d'obtenir des résultats positifs ce qui était à priori prévisible, la structure de la valine :



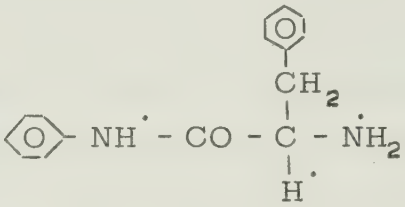
ne permettant de prévoir que deux liaisons avec un autre composé. Les racémiques expérimentés sont des amines ou acides aminés pris sous

forme d'anilides ou d'acétates, le meilleur résultat étant obtenu pour le couple polyacrylate de L phénylalanine - anilide de phénylglycine. La forme anilide est particulièrement favorable aux séparations par suite de la présence dans la molécule du groupement - C(=O) - NH - qui augmentera la mobilité de l'hydrogène lié au C*. L'isomère dextrogyre est fixé préférentiellement dans tous les cas, ce qui correspond à une association L-D plus stable, tout au moins pour la phénylalanine L (-), D (+).

Toutes les conditions expérimentales étant identiques, on obtient la (-) phénylglycine avec une pureté d'optique supérieure à la (-) phénylalanine ; l'association polymère (+) phénylglycine sera plus stable que l'association polymère (+) phénylalanine par suite d'une polarisation positive de l'hydrogène plus importante dans le premier cas où le noyau phényl lié directement au C* a une influence plus importante :



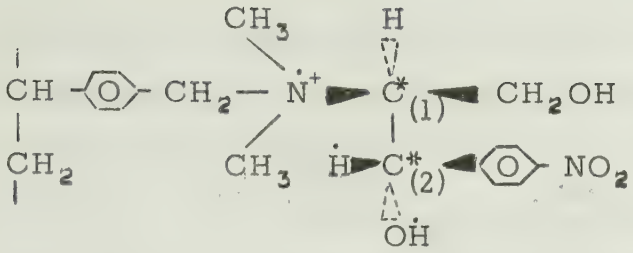
anilide de D φ glycine



anilide de D φ alanine

Suda et al. (b) résolvent à 90% des aminoacides basiques (DL lysine et ornithine) sur un échangeur du même type que précédemment renfermant de l'acide L pyroglutamique mais échouent devant les acides aminés neutres, ce qui confirme l'importance de l'existence de trois groupes réactifs dans le soluté.

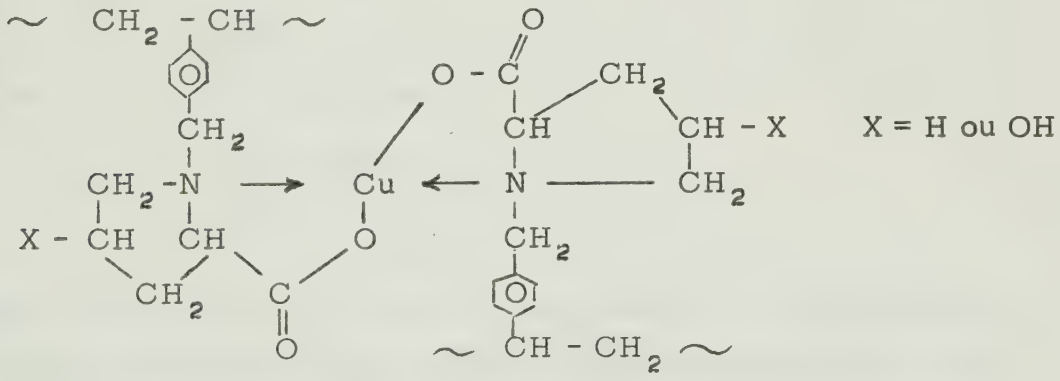
Rogozhin et al. (c) démontrent qu'une résine préparée à partir de polystyrène chlorométhylé aminé à la (-) threo [1 p-nitrophényl - 2 demethylaminopropane 1-3 diol] retient mieux l'acide D (-) mandélique que son antipode. La résine préparée soit :



possède quatre possibilités de liaisons dont trois interviendront : H et OH liés au C_2^* et N^+ au niveau duquel se fait l'échange ; il ne semble pas que l'asymétrie du C_1^* intervienne dans la séparation.

Au cours des quatre dernières années ces mêmes auteurs ont mis au point une technique de chromatographie de ligand qui paraît des plus prometteuses puisqu'elle aboutit à la résolution totale de proline ou hydroxy-proline racémique. Elle utilise la propriété de formation de complexes entre aminoacides et ions métalliques de transition.

La phase résine est constituée d'un squelette polystyrène chlorométhylé légèrement ponté - par exemple par 5% de -⟨O⟩-CH_2-⟨O⟩- -⟨O⟩- CH_2 -⟨O⟩- et aminé soit à la L proline soit à la L hydroxyproline ; en présence d'ions Cu^{II} - de nombre de coordination 4 - la résine donne le complexe $\bar{R} - Cu - \bar{R}$:



X = H ou OH

dont la stabilité diminue lorsque la saturation en Cu^{II} augmente par suite de l'introduction dans le réseau macromoléculaire de contraintes de plus en plus importantes.

En présence d'un ligand mobile A l'équilibre d'échange :

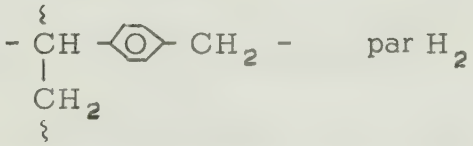
$$\bar{R} - Cu - \bar{R} + A \rightarrow \bar{R} - Cu - A + \bar{R}$$

aboutissant à un complexe mixte d'énergie libre supérieure à celle du complexe de départ, interviendra d'autant plus facilement que ce dernier était plus saturé en Cu^{II} donc moins stable.

Par ailleurs, Davankov et al. démontrent que l'énergie libre du complexe mixte formé est fonction de la configuration du ligand A. C'est ainsi que la différence d'énergie libre :

$$\delta \Delta G^\circ = \Delta G^\circ_{R - Cu - D\ prol.} - \Delta G^\circ_{R - Cu - L\ prol.}$$

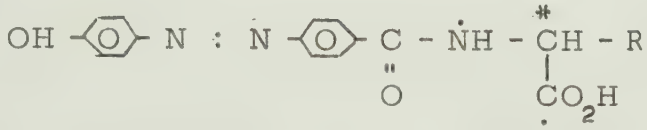
est de l'ordre de 300 à 400 cal. $mole^{-1}$, les plus grandes différences étant atteintes avec les résines les plus saturées en Cu^{II} (Davankov et al.). Cette différence de stabilité se traduit par des possibilités d'élution par un même ligand tout à fait différentes. Le racémique DL proline étant fixé sur la résine, l'énantiomère L sera élué sélectivement par une solution d'ammoniaque 0,1 - 0,2 N alors qu'une solution d'ammoniaque molaire sera nécessaire pour éluer ensuite l'énantiomère D. Lors d'une expérience continue on obtiendra donc deux pics d'élution totalement séparés. Au cours d'une expérience préalable (Rogozhin (a)), la même équipe avait obtenu 0,25 g de L (-) et 0,25 g de D (+) proline de pureté optique totale $\left([\alpha]_D = \pm 80°5\right)$ à partir de 0,50 g de racémique soit un rendement de 100%. Pour ce type de résolution, la formule du complexe mixte (identique à celle du complexe résine en remplaçant un des deux restes :



montre que seules deux liaisons interviennent, l'une des deux se formant plus facilement dans le cas d'un énantiomère que dans l'autre par suite vraisemblablement de l'encombrement stérique dû au noyau pyrrolidique qui provoquera une différence dans les énergies à developper pour que l'association ait lieu suivant qu'il s'agit de L-D ou L-L ; il y aura alors comme critère stéréosélectif deux liaisons support-substrat et un degré de liberté relatif limité par la configuration et non

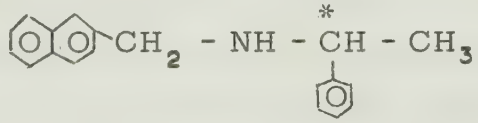
pas intervention d'une liaison en trois points.

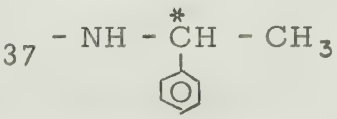
Une autre étude due à une équipe japonaise (Kaga Joïchi et al.) fait intervenir un phénomène du même type : il existe une différence d'énergie libre d'interaction de l'albumine du sérum de boeuf avec les isomères D ou L de colorants azoïques de formule générale :



pour lesquels on ne peut prévoir que deux points de contact autour de C* mais où l'un des substituants est encombrant. Si R est un méthyle, les $\Delta G°$ d'association sont respectivement 7041 et 6698 cal. $moles^{-1}$ pour D et L donc plus grandes pour des combinaisons L-D qui se formeront plus difficilement que L-L ; ceci est en accord avec les expériences sur polyacrylates d'acides L glutamique ou L aspartique qui faisaient aussi intervenir des groupes amidiques dans l'association phase stationnaire soluté.

Les échangeurs d'ions liquides ayant en règle générale des coefficients de sélectivité plus élevés que les résines correspondantes, Rieman et al. ont essayé de séparer les couples DL mandélate et DL N-acétyl-alanate sur deux amines optiquement actives qu'ils ont synthétisées : la (-) N 1 naphtyl α méthyl - benzylamine (S) et la (-) N octadecyl α méthyl benzylamine (K)

(S) 

(K) 

dont les configurations absolues ne sont pas données. Les résultats obtenus par chromatographie à contre courant démontrent l'existence d'une association préférentielle (-) amine - D (-) mandélate, le type d'interaction est le même que celui intervenant dans les deux

exemples précédents soit deux points de liaison support-substrat et une limitation du degré de liberté d'une molécule par rapport à l'autre due à la présence d'un substituant à gros encombrement stérique sur le C* de l'amine. Le rendement est faible, puisqu'on ne récupère que 5% de chacun des énantiomères avec une pureté optique de 99%.

Cette étude des résultats obtenus sur échangeurs synthétiques liquides ou solides permet dans certains cas d'aboutir aux mêmes conclusions que celles découlant des expériences sur composés asymétriques naturels qui ne sont qu'un cas particulier d'un concept plus vaste déterminant les possibilités de séparation stéréosélective : la notion de degré de liberté de la molécule de substrat par rapport à celle de solvant. Si les substituants autour des centres d'asymétrie sont peu volumineux, les énergies intervenant dans les deux premiers contacts intermoléculaires seront identiques ; mais ceux-ci limiteront les possibilités de déplacement relatif des deux molécules à une rotation autour d'un axe et la troisième liaison pourra se former plus ou moins facilement suivant la position des deux radicaux intervenant; si par contre l'un des substituants provoque un encombrement stérique important, celui-ci limitera le degré de liberté d'une molécule par rapport à l'autre dès qu'une liaison sera établie et une différence notable d'énergie existera dès la deuxième liaison.

III - 2.4 . Chromatographie en phase gazeuse.

Nous allons enfin étudier les résultats obtenus par chromatographie en phase gazeuse, méthode qui dans la mesure où les critères définis précédemment restent valables, devrait conduire à de bons résultats, puisque les molécules de substrat sont indépendantes

les unes des autres contrairement aux cas précédents où des liaisons intermoléculaires soluté-soluté ou soluté-solvant peuvent entraver l'établissement des contacts soluté-support chromatographique.

La chromatographie en phase gazeuse peut être appliquée au problème qui nous intéresse ici en suivant deux processus différents :

- ou bien on formera deux composés diastéréo-isomères à partir du racémique à séparer. On se trouvera alors en présence d'un mélange de deux corps doués de propriétés physiques bien différeciées (dont la tension de vapeur et les moments dipolaires) que l'on pourra séparer sur une phase stationnaire classique optiquement inactive.

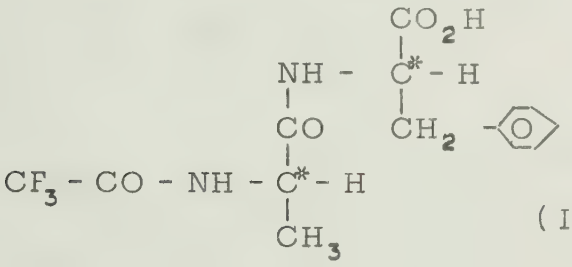
- ou bien on essaiera de séparer directement les énantiomères L et D ; on aura alors un mélange de deux composés aux propriétés physiques (autres que l'action sur la lumière polarisée) identiques et dont il faudra exploiter les différences de configuration en utilisant une phase stationnaire renfermant un centre d'asymétrie.

En fait, dans les deux cas, les possibilités de séparation seront étroitement liées à la formation plus ou moins facile de liaisons entre les substituants des deux centres d'asymétrie. Dans le premier cas il s'agira de liaisons intramoléculaires qui suivant qu'elles sont plus ou moins nombreuses, mobiliseront ou non tous les radicaux polaires, supprimant ou conservant des possibilités d'association phase stationnaire-phase gazeuse ; dans le second cas, il s'agira de liaisons intermoléculaires qui permettront la formation d'un complexe phase stationnaire-phase mobile plus ou moins solide.

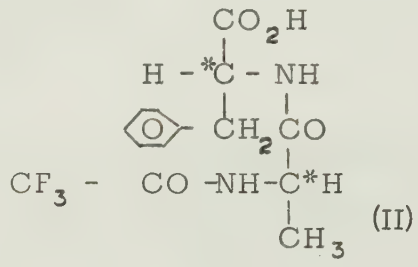
De nombreux succès ont effectivement été obtenus par la méthode comme le met en évidence l'étude bibliographique de Sanz Burato et al., sur les résultats acquis entre 1960 et 1968 et dont nous ne reprendrons ici que les principaux points en les confirmant ou précisant par des résultats plus récents.

III - 2.4. 1). Séparation de diastéréoisomères sur phase stationnaire inactive. Les premières expériences positives ont été conduites en utilisant le premier processus moins direct mais plus proche des séparations classiques.

Weygand et al. dès 1960 résolvent un mélange des esters méthyliques de deux dipeptides diastéréoisomères, la N-TFA - L alanyl-L phénylalanine (I) et la N-TFA-L alanyl-D phénylalanine (II), expérience qui aurait pu conduire à la résolution de phénylalanine racémique en complétant l'expérience par une hydrolyse des deux dipeptides isolés :



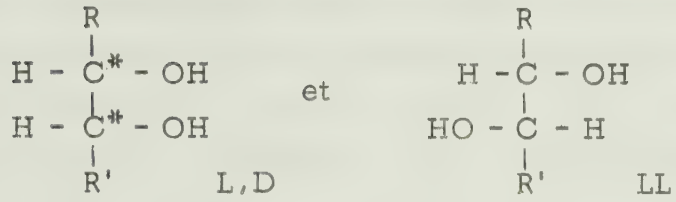
(I)



(II)

Mais ce n'est que l'année suivante qu'un travail du même genre est effectivement appliqué à une telle séparation : J. Casanova et E.J. Corey résolvent le ± camphre par l'intermédiaire de ses acétals cycliques avec le D (-) 2,3 butanediol, les résultats étant plus ou moins bons suivant la phase stationnaire utilisée. De nombreux autres travaux, particulièrement sur les diols, Gil Av (c) et peptides, Weygand, Gil Av et al. (e), sont ensuite couronnés de succès et mettent en évidence le fait que le composé érythro (LD ou DL) a toujours un meilleur volume de rétention que le thréo (DD ou LL). On remarque que les composés étudiés possèdent tous des groupements susceptibles de donner lieu à des liaisons hydrogène qui, suivant la configuration D ou L autour de chaque carbone asymétrique seront intramoléculaires ou resteront disponibles pour former une liaison avec la phase stationnaire.

Si l'on prend l'exemple d'un diol :



les conformations les plus probables, par suite de l'encombrement stérique des radicaux R et R' seront respectivement, en passant en représentation de Newman :

Donc, il y aura possibilité de liaisons intramoléculaires entre les hydroxyles pour LL et non pour LD qui sera susceptible de donner des liaisons hydrogène avec la phase stationnaire sur laquelle il sera mieux retenu.

De même, Gault et Felkin montrent que, dans le cas d'un alcool R-CH (CH_3) -CHOH-R' et en présence d'une phase stationnaire polaire, si R peut former une liaison hydrogène intramoléculaire avec -OH, c'est toujours l'isomère érythro qui est le plus retenu, c'est à dire celui dans lequel la proportion de molécules chélatées est la plus faible. Si R ne peut donner une telle liaison avec -OH, c'est au contraire la forme thréo qui est la plus retenue. Ceci met en évidence le rôle important joué par la possibilité de faibles liaisons substrat-phase stationnaire.

Au terme d'un important travail de séparation d'alcools racémiques sous forme d'esters d'acides R-CO_2 - $\overset{*}{C}$H (CH_3) CO_2H (ou R est le radical alkyl) et d'amino acides sous forme de leurs sels avec le 2-butanol et le 2-octanol, Gil Av et al. (a, b), concluent que la configuration et le mode de substitution autour des centres d'asymétrie déterminent le comportement chromatographique des diastéréoisomères.

Ils confirment que D-D (ou L-L) émerge toujours avant LD ou DL. D'autre part, l'augmentation de poids moléculaire due à un radical R plus important ne modifie pas le rendement des résolutions, ce qui s' explique aisément si l'on admet que, dès R = CH_3 , la conformation la plus probable est celle qui éloigne le plus les substituants de plus gros encombrement stérique.

Karger et son équipe étudient les séparations d'esters diastéréoisomères pour lesquelles ils suggèrent un mécanisme et ils aboutissent aux conclusions suivantes :

1). Dans les colonnes polaires, les différences de pression de vapeur et de solubilité des diastéréoisomères contribuent à la séparation.

2). Une augmentation de volume du substituant sur le centre asymétrique alcoolique augmente la séparation, ce qui est logique puisque la libre rotation autour de la liaison C-C sera de plus en plus gênée et des conformations correspondant à celles données précédemment pour un dialcool, en représentation de Newman, de plus en plus probables.

3). La distance des centres optiques joue un rôle important, la résolution étant d'autant meilleure qu'ils sont plus près l'un de l'autre, ce qui est aussi évident si l'on admet que la sélectivité est due en partie à l'existence ou non de liaisons intramoléculaires entre les substituants des 2 C asymétriques ; plus ces derniers seront éloignés, moins de telles liaisons auront de chance d'intervenir même pour la forme thréo et les possibilités de ponts hydrogène deviendront identiques pour les deux esters.

Confirmant ce point de vue, Halpern, Westley et Weinstein dans une communication sur les effets stériques autour d'une liaison peptidique supposent que les différences de pression de vapeur des diastéréoisomères augmentent avec le volume autour de la liaison amidique et concluent qu'une phase liquide polaire donne une meilleure séparation qu'une phase non polaire.

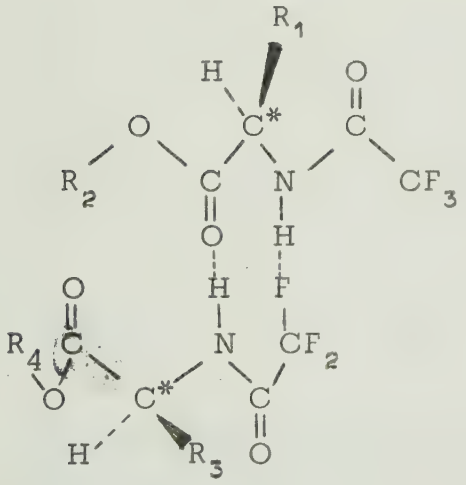
Ces mêmes auteurs (Westley) appliquent les conclusions précédentes au cas d'esters et d'amines N trifluoroacétylés et précisent que la rigidité de la molécule autour des centres d'asymétrie est un facteur favorable à la résolution ; c'est ainsi que les amines donnent toujours de meilleurs résultats que les esters en raison du caractère de double liaison partielle de la liaison carbone azote :

Ces quelques exemples montrent que les succès obtenus dans la séparation des diastéréoisomères par chromatographie en phase gazeuse, sont liés à la présence de radicaux polaires autour des centres d'asymétrie ; suivant leur position relative ces radicaux, ou bien donneront lieu à des liaisons intramoléculaires, ou bien seront disponibles pour former des liaisons intermoléculaires avec la phase stationnaire ; on obtiendra, dans ce dernier cas, une association phase stationnaire-diastéréoisomère plus stable. Il s'ensuit qu'un certain nombre de facteurs structuraux tels que la proximité des centres d'asymétrie et la rigidité moléculaire due à la présence d'une double liaison ou d'un substituant volumineux qui impose une conformation déterminée à la molécule - en gênant la libre rotation autour d'une liaison simple - favorisent la séparation. Il y aura d'autre part intérêt à utiliser une phase stationnaire polaire.

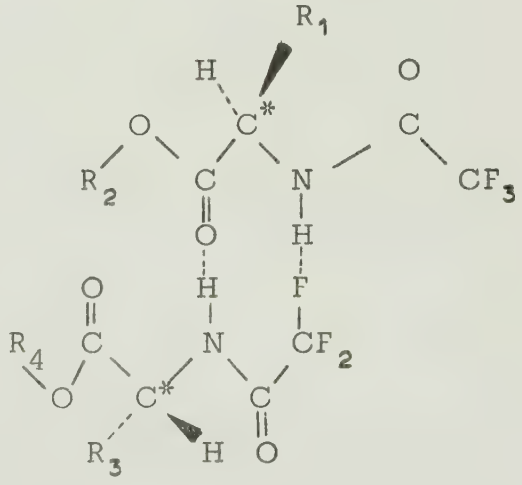
Le problème de la séparation est bien ici encore lié à une différence dans le nombre de liaisons qui pourront se former entre la phase stationnaire et chacun des deux diastéréoisomères, c'est à dire à l'existence d'une différence d'énergie libre de formation des deux associations phase stationnaire-composé LD (ou DL), et phase stationnaire composé LL (ou DD).

III - 2.4. 2). Séparation d'énantiomères sur phase stationnaire optiquement active. La première séparation directe d'énantiomères par chromatographie en phase gazeuse n'a été réalisée qu'en 1966. Dès 1959, Karagounis et Lippold avaient annoncé la résolution de quatre paires d'énantiomères : butanol secondaire, 2 bromobutane, 2 bromopropionate d'éthyle et 2 bromobutyrate d'éthyle sur D tartrate d'éthyle ; ce résultat qui n'a jamais été reproduit, n'est en fait, comme quelques autres, que la conséquence d'une mauvaise attribution des pics obtenus dûs réellement à des produits de décomposition du composé injecté, ce que démontrent expérimentalement Sanz Buruta et al., Par contre en 1966, Gil Av et al. (b) résolvent effectivement 18 racémiques d'acides α aminés en utilisant des esters d'α amino acides trifluoroacétylés comme phase stationnaire (par ex. cyclohexylate de N trifluoroacétyl-isoleucine D ou L). Les produits à résoudre sont eux aussi trifluoroacétylés et de préférence sous forme d'esters tertiobutyrique ; Gil Av suppose qu'il y a formation de complexes diastéréoisomères de stabilité différente entre soluté et solvant grâce à deux liaisons hydrogène.

phase stationnaire D



énantiomère L

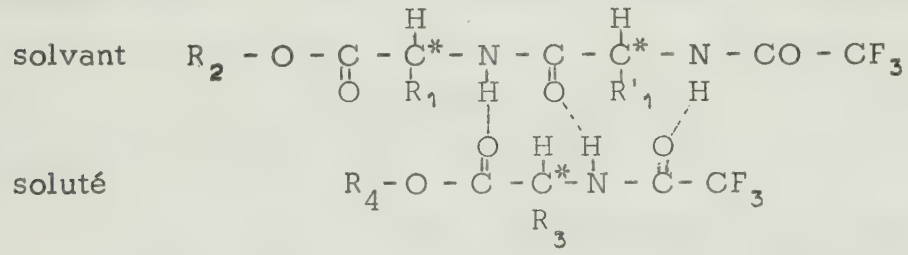


énantiomère D

Les déterminations d'enthalpie libre de formation de ces deux diastéréoisomères mettent en évidence une différence $\Delta(\Delta G_o)$

de 1,7 k cal. $mole^{-1}$ qui correspond exactement à l'énergie requise pour former une liaison hydrogène. Il semble donc que la différence de stabilité des deux diastéréoisomères qui s'explique difficilement à partir du schéma de Gil Av soit en fait due à l'existence d'une troisième liaison qui ne peut se former que dans un cas par suite des configurations de chaque énantiomère. Cette hypothèse est confirmée par la nécessité de N trifluoroacétylation de l'ester d'aminoacide composant la phase stationnaire ; en effet l'expérience prouve que la présence du groupement - $COCF_3$ est indispensable à l'obtention d'une résolution valable bien que ce groupement n'intervienne pas directement dans une liaison intermoléculaire. Ce fait peut s'expliquer par l'existence d'un effet inductif du radical TFA, très attracteur d'électrons, qui va augmenter la mobilité de l'hydrogène lié au C*; celui-ci pourra alors intervenir dans une liaison avec le groupement carboxyle du soluté ; mais, par suite de l'encombrement stérique dû aux radicaux R, cette liaison sera plus difficile à établir dans le cas du complexe DL donc l'antipode L émergera en premier ce que confirme l'expérience.

La même équipe décrit ensuite diverses expériences de résolution faisant intervenir un ester dipeptidique N acylé comme phase stationnaire. B.Feibush et Gil Av., interprétant les résultats obtenus sont alors conduits à admettre l'existence de trois liaisons hydrogène :



qui imposeront au soluté une conformation particulière plus ou moins facile à atteindre suivant sa configuration. Les groupements trifluorométhylés n'interviennent ni directement ni indirectement et les résultats sont d'ailleurs presque aussi bons en reprenant le même couple solvant-soluté non acylés. Par contre le facteur de séparation obtenu est d'autant

plus grand (jusqu'à 1,20) que l'encombrement stérique des radicaux R_2 et R_4 est plus important, diminuant ainsi plus fortement les chances de formation de la troisième liaison pour l'un des énantiomères.

La structure des associations phase stationnaire dipeptidique-aminoacide est confirmée par une série d'essais dûs à J.A. Corbin, J.E. Rhoad et L.B. Rogers (c) qui comparent les facteurs de séparation α pour un racémique donné (l'ester isopropylique de N. TFA alanine) sur trois phases stationnaires :

l'ester cyclohexylique de N. TFA - L valyl - DL valine
" " " - L valyl - L valine
" " " - DL valyl - L valine

les deux premières conduisent à des α = 1,10 et 1,20 respectivement (à 90°C) alors qu'il n'y a aucune séparation dans le dernier cas. Ceci confirme l'importance de l'extrémité amidique dans la séparation. Ils démontrent de plus que la nature des radicaux R, influence la résolution d'une manière variable suivant le soluté mais identique quelle que soit l'extrémité dipeptique où a lieu la modification : pour un soluté donné, on trouve le même α pour les esters cyclohexyliques de N. TFA L leucyl - L valine et de N. TFA L valyl - L valine. Ceci met en évidence l'existence d'une contribution stérique importante des deux extrémités amidique et ester de la phase stationnaire même si l'interaction principale se fait au niveau de l'extrémité amide. Les résultats obtenus varient assez peu lorsqu'on passe d'une phase dipeptide au tripeptide, ce qui prouve que le groupe carboxylique n'intervient pas dans une liaison entre soluté et phase stationnaire.

Pour le soluté, une augmentation du volume du radical R_4 s'accompagne toujours d'une augmentation de la résolution, mais il semble qu'une telle modification sur R_3 ait l'effet inverse (la résolution de la N. TFA DL valine est inférieure à celle de la N.TFA DL alanine sur toutes les phases stationnaires expérimentées).

Corbin et Rogers (a) étudient par ailleurs l'influence de la température sur la résolution et comparent les résultats obtenus

sur une même phase stationnaire à l'état liquide et à l'état solide. Les α varient de 1,04 à 1,13 dans le premier cas, de 1,31 à 1,92 dans le second cas. Cette amélioration considérable confirme que la sélectivité est bien due à la formation de liaisons de faible énergie qui sera d'autant plus facile que la température est plus basse.

La stéréosélectivité obtenue grâce à la chromatographie en phase gazeuse, que l'on passe ou non par l'intermédiaire de sels diastéréoisomères du racémique à résoudre, est donc bien due à l'établissement de liaisons de faible énergie en nombre différent ou de stabilité différente entre la phase stationnaire et chacun des diastéréoisomères ou énantiomères ; elle obéit aux mêmes critères que ceux mis en évidence précédemment et il semble que la possibilité d'interaction en trois points soit le plus souvent la condition déterminante de la résolution. Le facteur de séparation α est relié à la différence entre les enthalpies libres de formation des deux associations qu'il permet de calculer par la formule :

$$\Delta (\Delta G_o) = - RT \text{ Log } \alpha$$

Calculant par ailleurs la valeur de ΔH_o , enthalpie de formation de chaque association, Corbin et Rogers (b) peuvent évaluer la contribution de l'enthalpie (représentant la somme des énergies de liaison) et de l'entropie (représentant la barrière énergétique, due par exemple aux empêchements stériques) dans cette variation enthalpie libre.

De même Parr et Howard calculent les différences d'enthalpie et d'entropie des associations entre esters isopropyliques de N-TFA D ou L amino acides (phase mobile) et ester cyclohexyliques de N-TFA L-L dipeptides (phase stationnaire) ; $\Delta (\Delta H_o)$ varie entre 200 et 400 calories $mole^{-1}$ suivant les cas, alors que $\Delta (\Delta S_o)$ est toujours inférieure à 1 calorie $mole^{-1} degré^{-1}$. On voit donc que dans ce cas la différence de stabilité des associations est due à une différence d'enthalpie du même ordre de grandeur que celle observée dans

le cas de la chromatographie de ligand. La sélectivité obtenue est donc conséquence d'une différence de solidité de liaison et non pas d'une différence d'organisation puisque l'entropie varie fort peu d'une association à l'autre.

III - 3. Conclusion.

Donc en conclusion générale on peut, admettre que l'obtention d'une séparation d'énantiomères est éventuellement possible si les enthalpies libres ΔG_o d'association ou de cristallisation sont différentes pour les deux composés à séparer.

Cette différence Δ (ΔG_o) pourra être due :

- soit à une variation d'enthalpie, ce qui sera le cas si le nombre de liaisons support-soluté varie suivant l'énantiomère, ou bien, si la formation d'une au moins de ces liaisons requière une énergie plus ou moins grande suivant l'antipode considéré ;

- soit à une différence d'entropie, ce qui sera le cas si l'organisation de la molécule intervient ; ainsi, dans la cristallisation la variation de ΔG_o est due à la seule entropie ; de même, l'énergie rotationnelle est de caractère entropique et est liée à la géométrie de la molécule, en particulier à l'encombrement stérique des substituants du C asymétrique.

La création d'une première liaison, en général forte, entre support chromatographique et soluté limitera le degré de liberté d'une molécule par rapport à l'autre, mais correspondra à une même énergie de liaison. Si les mouvements d'une molécule par rapport à l'autre sont limités, non seulement par la première liaison mais encore par des facteurs stériques, on conçoit que la configuration des énantiomères se manifeste dès l'établissement de la deuxième liaison support-soluté, cette dernière absorbant une énergie plus ou moins grande suivant qu'il est plus ou moins difficile aux radicaux intervenant dans la liaison de se placer dans une position convenable. Si, au contraire,

aucun facteur stérique ne limite le degré de liberté relative des deux molécules, la deuxième liaison jouera ce rôle limitatif mais se formera elle-même avec la même facilité pour les deux antipodes et la différence d'énergie libre n'apparaîtra qu'au niveau d'une troisième liaison, soit que celle-ci se forme dans les deux cas mais en requérant un apport d'énergie plus ou moins grand selon la tension créée dans le complexe.

Il apparaît donc ainsi que le critère de stéréosélectivité d'un support chromatographique pour un racémique donné réside dans les possibilités de limitation puis de suppression de la liberté de rotation d'une des molécules par rapport à l'autre ; l'établissement de trois points de contact entre les deux molécules est un cas particulier satisfaisant cette condition mais n'est pas impératif si des facteurs stériques interviennent qui suppriment un degré de liberté.

Du point de vue pratique, il ressort que parmi toutes les approches qui nous ont permis de dégager les conditions nécessaires à une séparation d'énantiomères, trois seulement conduisent à des résultats exploitables aussi bien du point de vue du rendement que de celui de la pureté optique et sont en outre susceptibles d'une certaine généralisation : ce sont la cristallisation, la chromatographie en phase gazeuse et la chromatographie de ligand. Toutes les autres méthodes et en particulier la chromatographie sur résine asymétrique dont nous avons tenté d'exploiter les possibilités au cours de ce travail, n'ont conduit qu'à des résultats fractionnaires non généralisables et à des rendements toujours médiocres ($< 10\%$).

- La cristallisation stéréosélective n'a lieu que dans le cas des diastéréoisomères (acide tartrique par exemple) ou lorsque l'encombrement stérique autour du centre d'asymétrie est important : c'est ainsi que les α aminoacides pris sous forme d'arylsulfonates peuvent être séparés par cristallisation stéréosélective ce qui est impossible pour les acides seuls :

Par ailleurs pour obtenir une telle cristallisation il est nécessaire soit d'ensemencer la solution sursaturée de racémique avec un cristal optiquement pur de l'isomère désiré, soit d'ajouter dans la solution une petite quantité de ce même énantiomère (ce qui revient au même, le composé à plus grande concentration cristallisant en premier lieu). Pour qu'il y ait sélectivité, il faut en fait que les énergies de réseau cristallin (énergies de Haber) soient suffisamment différenciées pour les deux énantiomères (ou diastéréoisomères) ; on voit ainsi apparaître le rôle de l'encombrement des substituants du ou des carbones asymétriques qui, suivant leur position relative, vont permettre un empilement moléculaire à partir du germe entraînant des tensions plus ou moins importantes dans chaque molécule et conduisant donc à une organisation du réseau cristallin nécessitant plus ou moins d'énergie. C'est évidemment la cristallisation de plus basse énergie qui aura lieu préférentiellement ; rappelons que la différence d'énergie impliquée ne peut être que d'origine entropique puisque représentant l'énergie engagée dans le passage d'un état désorganisé du soluté à un état organisé au cours duquel les liaisons moléculaires fortes ne sont pas modifiées mais où quelques faibles liens assurant la cohésion du cristal se créent.

- La chromatographie en phase gazeuse peut être appliquée soit à séparation de diastéréoisomères sur phase stationnaire classique soit à la séparation d'énantiomères sur phase stationnaire asymétrique. Dans un cas comme dans l'autre la différence de rétention sur phase stationnaire des deux composés à séparer trouve son origine dans la possibilité pour chacun d'eux de former plus ou moins de faibles liens avec la phase stationnaire, soit que le nombre de radicaux pouvant intervenir soit différent (cas des diastéréoisomères dans lesquels certains radicaux sont mobilisés dans des liaisons intramoléculaires, soit que la position relative de ces radicaux soit plus ou moins favorable (cas des énantiomères en présence d'une phase

stationnaire asymétrique). Ceci se traduit par la formation de deux associations entre phase stationnaire et chacun des deux composés à séparer ayant des enthalpies bien différenciées : il suffit d'un Δ ($\Delta H°$) de l'ordre de 200 à 400 cal. $mole^{-1}$ pour que la séparation soit satisfaisante, ce qui est très faible, nettement inférieur même à l'énergie nécessaire à la création d'une liaison hydrogène (1,7 Kcal.).

- La chromatographie de ligand pour laquelle la stéréosélectivité s'établit au niveau des orbitales orientées de l'ion métallique de transition (Cu^{II}) impliqué dans la formation du complexe mixte résine asymétrique - Cu^{II} - acide aminé D ou L. Là encore la différence entre les enthalpies libres de formation Δ ($\Delta G°$) est de 300 à 400 cal. $mole^{-1}$ soit exactement du même ordre de grandeur que celle intervenant dans le cas précédent. Cette méthode est particulièrement efficace puisqu'elle permet d'atteindre à la fois une pureté optique et un rendement de 100% ; mais elle est peut-être plus limitative que la précédente puisqu'elle ne peut s'appliquer qu'aux composés possédant des propriétés de ligand.

On voit donc qu'il est possible d'aboutir à des séparations efficaces d'inverses optiques en utilisant des différences d'énergies entre deux composés extrêmement faibles, toujours nettemant inférieures à celles impliquées dans les séparations chimiques qui paraîssent devoir être de l'ordre de plusieurs K calories pour que la séparation soit efficace et inférieure même à l'énergie impliquée dans la formation d'une liaison hydrogène.

BIBLIOGRAPHIE

- AMARIGLIO A. a). Thèse de doctorat d'état - Nancy 1967.
  b). Bull. Soc. Chim. 1969, 5, 1539.
- BAKER C.A. ; WILLIAMS R.J. J. Chem. Soc. 1956, 2352.
- BOSH A. J. Chem. Educ. 1969, 46 (10) 691.
- BRADLEY W. ; EASTY G.C. J. Chem. Soc. 1951, 499.
- BUNNET J.F. ; MARKS J.L. J. Amer. Chem.Soc. 1952, 74, 5893.
- CANTACUZENE - Cours C_3 Chimie Physique. Université Paris VI.
- CASANOVA J. ; COREY E.J. Chem. Ind. (Londres) 1961, 1664.
- CORBIN J.A. ; ROGERS L.B. a). Anal. Chem. 1970, 42 (14) 1786.
  b). " " " 42 (9) 974.
- CORBIN J.A. ; RHOAD J.E. Anal. Chem. 1971, 43 (3) 327.
- CRAM ; HAMMOND
- CREEK R.D. Poultry Sc. 1969, 48 (2) 748.
- DALGLIESH D.E. a). J. Chem. Soc. 1952, 137.
  b). Biochem. J. 1952, 52, 3.
  c). J. Chem. Soc. 1952, 3940.
- DAVANKOV V.A. ; ROGOZHIN S.V. ; SEMECHKIN A.V. ; SACHKOVA T.D.
  J. of Chromat. 1973, 82, 359.
- DENT C.E. Biochem. J. 1948, 43, 169.
- FEIBUSH B. ; GIL AV E. Tetrahedron 1970, 26 (5) 1361.
- GAULT ; FELKIN Bull. Soc. Chim. France - 1965, 3 , 742.
- GENTARO NOYORI ; MITSURU HONDA Japan 69 - 28085 (Cl 16 B 652)
  20 nov. 1969.
- GIL AV E. ; CHARLES SIGLER R. et al. a). J. Gas Chromatog. 1966,
  4 (1) 8.

b). J. Gas. Chromatog. 1966, 4 (2) 51.
c). J. Chromatog. 1965, 17 (408).

- GIL AV E. : PARR W. et al. J. Chromatog. Sc. 1970, 8 (10) 591.

- GIL AV E. ; NUROK D. Proc. Chem. Soc. 1962, 146.

- GONCI D.A. ; PURDY W.C. Séparation Science 1969, 4 (3) 243.

- GRUBHOFER N. ; SCHLEITH L. Naturwiss. 1953, 40, 508.

- HALPERN B. ; WESTLEY J.W. ; WEINSTEIN B. Nature, 1966, 210 , 337.

- HENDERSON G.M. ; RULE H.G. a). Nature 1938, 141 , 917.
b). J. Chem. Soc. 1939, 1568.

- INGERSOLL A.W. Org. Synth. Vol. II p. 506, 1957.

- KAGA JOICHI et al. Nippon Kagaku Zasshi, 1969, 90 (4) 411.

- KARAGOUNIS G. ; LIPPOLD G. Naturwissenschaften 1959, 46, 145.

- KARGER B.L. ; ROSE H.C. ; STERN R.L. Anal. Chem. 1966, 38 , 469.

- KLABUNOVSKI E.I. Thèse, Institut de Chimie Org. de l'Académie des Sciences d'URSS. 1966 p. 102.

- KLABUNOVSKI E.I. ; PETROV YU I. Ionoobmen. Mater. IKh. Primen. 1968, 273.

- KOEGEL R.J. et al. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1957, 69, 94.

- KRATCHANOV Chr. ; POPOVA M. J. of Chromat. 1969, 43, 66.

- KREBS H. ; WAGNER J.A. ; DIEWALD J. Chem. Ber. 1966, 99, 1341.

- KREBS H. Die Trennung von racematen auf chromato graphischem. Wege, Westdeutscher Verlag, 1956.

- LOTT J.A. ; RIEMAN W. J. Org. Chem. 1966, 31 , 561.

- MANECKE G. ; FORSTER H.J. a). Makromol. Chem. 1966, 91, 136.
b). Naturwiss. 1967, 54 , 531.
c). " 1967, 54, 647
d). J. Pol. Sci. 1970, 30 , 607.

- MARTIN H. ; KUHN W. Z. Elektrochem. 1941, 47, 216.

- MINORU HIRAMOTO Japan 70, 11, 113 (Cl 36 D25) 25 ap. 1970, Appl. 10 nov. 1967.

- OHARA M. et al. Bull. Chem. Soc. Japan 1962, 35, 2049.

- PARR W. ; HOWARD P.Y. Anal. Chem. 1973, 45 (4) 711.

- PASTEUR L. Ann. Chim. 1852, 34, 46.

- ROGOZHIN S.V. ; DAVANKOV V.A. et al.

a). URSS 275400 (Cl CO8f) 03 jul. 1970. Appl. 15.1.69.

b). Ger. Offen. 1, 932, 190 (Cl BO1d) 08 jan. 1970, URSS Appl. 01 jul. 1968.

c). SSSR. Ser. Khim. 1971, 2 , 459.

d). Russian Chem. Reviews 1968, 37 (7) 565.

e). Fr. Demande 2012102 (Cl BO1d) 13 Mars 1970, URSS Appl. 01 jul. 1968.

- RIEMAN W. ; ROMANO S.J. et al. Talanta 1969, 16, 581.

- SANZ-BURATO ; IRRURE PEREZ J. et al. Afinidad 1969, 427.

- SCHMITT J.H. ; ZENK M.H. Proc. Int. Conf. Methods. Prep. Ster. Label Compounds 2nd 1966 (Puf. 1968) 305.

- SHIRO KUDO ; HIRONORI HISAYA, Japan 68, 15. 401 (Cl 16 B65) 28 june 1968, App. 25 Ag 66.

- SUDA H. ; ODA R. a). Mem. Fac. Tech. Kanazawa Univ. 1960, 2 , 215.

- SUDA H. and al: b). HOSONO Y. ; HOSAKANA Y. SETO T. Kogyo Kagabu Zasshi, 1970, 73 (6) 1250.

- TEIKO WATANABE ; GENTARO NOYORI, Kogyo Kagabu Zasshi 1969, 72, 5, 1080.

- THIEMANN W. ; WAGENER K. Angew. Chem. Intern. Edit. 1970, 9, 740.

- TROCHIMOZUK W.M. ; RABEK T.I. Intern. Symp. Macromol. Chem. Prague 1965.

- TSUBOYAMA S. ; YANAGITA M. ; Sci. Papers, Inst. Phys. Chem. Rer. Tokyo 1959, 53, 245.

- VERT M. Thèse 3ème cycle, Paris.

- VERMEULEN Th. Industrial and engineering Chem. 1968, 60 (8) 12.

- VOGLER K. ; KOFLER M. ; Helv. Chim. Acta 1956, 39, 1387.

- WESTLEY J.W. ; HALPERN B. ; KARGER B.L. Anal. Chem. 40, 2046.

- WEYGAND F. et al. Z. Physiol. Chem. 1960, 322, 38.

- YAMADA HIROMI et al. 6806447 (Cl 16B652) 9 Mars 68, Appl. 23.3.66.

- YAMADA SHIGEKI et al. J. Org. Chem. 1973, 38 (26) 4408.

- YAMASHITA TETSUSHI ; NAKAMURA NOHUO, Bull. Chem. Soc. Japan 1970, 43 (6) 1809.